

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Allison Takeo Tsuge

**Estudo da espectroscopia de fluorescência a *laser* em
fígados de ratos com isquemia hipotérmica.**

**Study of *laser* fluorescence spectroscopy in livers of rats with
hypothermic ischemia.**

Ribeirão Preto

2023

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Allison Takeo Tsuge

Estudo da espectroscopia de fluorescência a *laser* em fígados de ratos com isquemia hipotérmica.

Study of *laser* fluorescence spectroscopy in livers of rats with hypothermic ischemia.

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)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

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

Ribeirão Preto

2023

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.

Tsuge, Allison Takeo

Estudo da espectroscopia de fluorescência a *laser* em fígados de ratos com isquemia hipotérmica. Ribeirão Preto, 2023.

49 p.: il. 12; 30cm

Tese (Doutorado em Ciências Médicas), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Castro e Silva, Orlando.

Dedicatória

Para Renata, minha amada esposa, ao meu pai e minha mãe (in memoriam).

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado e me conceder saúde, sabedoria, paciência, perseverança e humildade.

Ao Prof. Orlando de Castro e Silva Junior, agradeço pela oportunidade, paciência, ensinamentos, conselhos, broncas, e principalmente pela inabalável confiança depositada em mim e na pesquisa. Minha sincera admiração.

Ao Prof. Eleazar Chaib, que foi a primeira pessoa a me receber nesta pesquisa, e cuja oportunidade rendeu todo este programa de doutoramento.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, pelo apoio e amor incondicionais.

À minha esposa Renata, pela paciência e incentivo diário, sem o qual, com certeza, eu não teria tido forças para concluir esta pesquisa.

À Jaqueline de Jesus Pereira, meus sinceros agradecimentos por toda a sua ajuda, presteza, ensinamentos e incomparável dedicação. Por ter me acompanhado no passo a passo da confecção desta tese.

Ao José Dirceu Vollet Filho, pela ajuda inestimável com seus conhecimentos teóricos e práticos em Física, pelos equipamentos, por sua extrema e inconfundível boa vontade. Sem sua participação não teríamos nem começado a pesquisa.

À Camila Rodrigues Moreno, pelos gráficos e estatísticas fundamentais à tese, dos quais sozinho não saberia nem por onde começar.

À Marina Rodrigues Garcia da Silveira, por me mostrar com propriedade como deveria executar as cirurgias nos ratos Wistar.

Ao Lourenilson José de Souza, que sempre acreditou em mim, e que sempre me incentivou a buscar conhecimentos, especialmente na área científica da Medicina, além de ter sido o responsável por me apresentar os Professores desta pesquisa. Sinceros agradecimentos.

À banca de qualificação, Prof. Ajith Kumar Sankarankutty e Prof. Lourenço Sbragia Neto, cujas críticas e sugestões, além do grande incentivo, fizeram com que este trabalho ganhasse muito mais qualidade e refino.

Ao Prof. Flavio Henrique Ferreira Galvão, por me ajudar a conseguir os subsídios e o espaço para a execução da pesquisa.

À Profa. Márcia Saldanha Kubrusly, pelos ensinamentos fundamentais à pesquisa, pelos esclarecimentos e paciência.

A toda equipe do Laboratório de Transplante e Cirurgia do Fígado (LIM 37), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em especial à Sandra, à Valcineia, ao Genilton, ao Genivaldo, ao Roberto, à Márcia, além dos Profs já citados, Orlando, Eleazar e Flávio, por me concederem os materiais e equipamentos para a realização desta pesquisa, pelo companheirismo e trabalho em equipe.

Aos meus amigos Fernanda, Keila e Orlando, do Laboratório de Miocardiopatias do Instituto do Coração (InCor), e Solange, do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Coração (InCor), pelo companheirismo e trabalho em equipe.

Ao Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pela cessão dos equipamentos, por toda a ajuda e parceria.

Ao Laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), por toda a ajuda, disponibilidade e carinho.

Ao Laboratório de Patologia Cardíaca do Instituto do Coração (InCor), por toda a ajuda, disponibilidade e carinho.

Ao Núcleo de Inovação do Instituto do Coração (INOVAInCor), por toda a ajuda, disponibilidade e carinho.

Ao Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), pela oportunidade da execução desta pesquisa.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), pela oportunidade de ser aluno da pós-graduação.

À CAPES – o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código do financiamento 001.

Epígrafe

“Conhecimento é o segredo de um futuro brilhante. Lembre-se disso quando pensar em desistir.”

- Karyne Santiago

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de diagramas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1. Introdução	21
1.1. <i>Regeneração hepática e fotobioestimulação</i>	23
1.2. <i>Espectroscopia de fluorescência</i>	25
1.3. <i>Parâmetros das fontes de luz laser</i>	26
2. Objetivo	29
2.1. <i>Objetivos secundários</i>	29
3. Material e método	30
3.1. <i>Ambientação da pesquisa</i>	30
3.2. <i>Casuística</i>	30
3.3. <i>Anestesia</i>	31
3.4. <i>Procedimentos cirúrgicos</i>	31
3.5. <i>Obtenção de dados de fluorescência – Espectroscopia</i>	35
3.6. <i>Fotobioestimulação</i>	38
3.7. <i>Técnica de Imunohistoquímica (análise de Ki67)</i>	39
3.8. <i>Compilação dos dados da espectroscopia de fluorescência</i>	41
3.9. <i>Análise estatística</i>	41
4. Resultados	42
4.1. <i>Peso dos animais</i>	42
4.2. <i>Análises espectrofotométricas</i>	42
4.3. <i>Análise imunohistoquímica (Ki67) e comparativo com análise espectrofotométrica</i>	44

5. Discussão	47
6. Conclusão	51
7. Anexos	52
<i>7.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa</i>	<i>52</i>
8. Referências	53
9. Apêndice	60
<i>9.1. Artigo Original publicado em periódico</i>	<i>60</i>

Lista de figuras

- Figura 1.** Início do procedimento cirúrgico (aparando pelos); B – Incisão mediana e abertura da cavidade abdominal; C – Hepatectomia a 70% propriamente dita, ligadura de pedículo hepático 32
- Figura 2.** A – Momento da punção do ventrículo esquerdo; B – Secção da veia cava infra-hepática; C – Perfusão propriamente dita com consequente troca do sangue hepático pela solução SPS-1; D – Fígado totalmente perfundido com SPS-1: observa-se a ausência de sangue pela alteração de coloração 32
- Figura 3.** Desenho esquemático da anatomia do fígado do rato Wistar, onde cada lobo tem seu tamanho relativo apresentado. **PC**, processo caudal; **LCA**, lobo caudado anterior; **LCP**, lobo caudado posterior; **LSLD**, lobo superior lateral direito; **LILD**, lobo inferior lateral direito; **LM**, lobo mediano; **LMD**, porção direita do lobo mediano; **LME**, porção esquerda do lobo mediano; **LLE**, lobo lateral esquerdo; **FM**, fissura mediana; **FE**, fissura esquerda; **FD**, fissura direita; **LF**, ligamento falciforme. *Fonte Martins e Neuhaus, 2007 33
- Figura 4.** A – Momento da hepatectomia total; B – Hepatectomia total propriamente dita, aspecto da anatomia do fígado de rato Wistar 34
- Figura 5.** Imagem ilustrativa do Espectrofotômetro de Fluorescência (Castro-e-Silva *et al*, 2008) 36
- Figura 6.** A - Foto do espectrofotômetro de fluorescência utilizado nas análises do estudo - sonda óptica utilizada para a coleta da fluorescência emitida (seta vermelha), laptop para visualização dos gráficos de ondas emitidas (seta verde); B – Laptop mostrando espectro proveniente da leitura da captação da luz emitida; C - Momento da análise com luz 405 nm (violeta); D – Momento da análise com luz 533 nm (verde) 36
- Figura 7.** Foto esquemática mostrando os pontos de leitura de espectrofotometria deste estudo. LLE – Lobo Lateral Esquerdo 37
- Figura 8.** A – Foto do aparelho gerador de luz laser; B – Momento de irradiação do fígado com *laser* para fornecimento de energia às células hepáticas 39

Figura 9. Detalhe do local da coleta das amostras de fígado (lobo lateral esquerdo) para análise imunohistoquímica; fotomicrografia de hepatócitos imunomarcados com anticorpo anti-Ki67	40
Figura 10. Imagens ilustrativas do programa utilizado para análise dos dados obtidos a partir da leitura com o espectrofotômetro. A imagem à esquerda demonstra os valores dos comprimentos de onda tabulados para análise posterior.....	41
Figura 11. Gráficos da análise espectrofotométrica de Todos os Grupos nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com <i>Laser</i> e Sem <i>Laser</i>	42
Figura 12. Gráficos da análise espectrofotométrica do Grupo FTNP nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com <i>Laser</i> e Sem <i>Laser</i>	43
Figura 13. Gráficos da análise espectrofotométrica do Grupo FTP nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com <i>Laser</i> e Sem <i>Laser</i>	43
Figura 14. Gráficos da análise espectrofotométrica do Grupo HPS nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com <i>Laser</i> e Sem <i>Laser</i>	44
Figura 15. Gráficos da análise espectrofotométrica do Grupo HPP nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com <i>Laser</i> e Sem <i>Laser</i>	44
Figura 16. A - compilação das análises de espectrofotometria de fluorescência de todos os grupos, nos comprimentos de onda de 405 nm e 532 nm. B – comparativo das análises imunohistoquímicas de Ki67 de todos os grupos (Grupos SL – Sem <i>Laser</i> ; Grupos L – Com <i>Laser</i>)	45

Lista de tabelas

Tabela 1. Disposição da casuística do estudo 31

Tabela 2. Média \pm DP do peso dos animais de cada grupo, em gramas 42

Lista de diagramas

- Diagrama 1.** Quadro esquemático da sequência de procedimentos realizados nos animais de todos os grupos, **SEM** o fornecimento de energia sob a forma de *laser* 660 nm 34
- Diagrama 2.** Quadro esquemático da sequência de procedimentos realizados nos animais de todos os grupos, agora **COM** o fornecimento de energia sob a forma de *laser* 660 nm 35
- Diagrama 3.** Quadro esquemático da quantidade e sequência de análises espectrofotométricas realizadas nos animais de todos os grupos de estudo – Controle Interno (imediatamente após abertura de cavidade abdominal); – Tempo 0 (T0), imediatamente após perfusão com solução SPS-1; – Tempo 24 horas (T24), após 24h de preservação hipotérmica 38

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

DNA Ácido desoxirribonucleico.

FAD Flavina adenina dinucleotídeo.

FD Fissura direita.

FE Fissura esquerda.

FM Fissura mediana.

FTNP Fígado total não perfundido.

FTP Fígado total perfundido.

FR Fígado remanescente.

HPP Hepatectomia parcial com perfusão “*ex situ*”.

HPS Hepatectomia parcial sem perfusão “*in situ*”.

HP Hepatectomia parcial.

Ki67 Proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M).

LCA Lobo caudado anterior.

LCP Lobo caudado posterior.

LF Ligamento falciforme.

LILD Lobo inferior lateral direito.

LLE Lobo lateral esquerdo.

LM Lobo mediano.

LMD Porção direita do lobo mediano.

LME Porção esquerda do lobo mediano.

LSLD Lobo superior lateral direito.

NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo.

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

PC Processo caudal.

SPS-1 Solução de preservação estática.

Resumo

Tsuge AT. **Estudo da espectroscopia de fluorescência a laser em fígados de ratos com isquemia hipotérmica.** Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introdução: Após hepatectomia parcial, o fígado remanescente apresenta resposta regenerativa, mantendo relação percentual com o hospedeiro. Não há dados precisos na literatura sobre viabilidade hepática após injúria tecidual durante preservação hipotérmica. A espectroscopia pode fornecer informações sobre tecidos por sua capacidade de mensurar a fluorescência, desde que haja estimulação adequada. Técnicas de espectroscopia têm sido investigadas como novos métodos para estudo e análise de parâmetros teciduais. **Objetivo:** Avaliar, em modelo experimental, a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência a *laser* no tecido hepático proveniente de hepatectomias, utilizando-se a proliferação celular (avaliada através de imunohistoquímica de Ki67) como controle. Objetivos secundários, comprovar, através desta técnica, a viabilidade do tecido hepático após 24h de hepatectomia parcial, em condições hipotérmicas. Analisar a regeneração do fígado remanescente após 24 horas de hepatectomia parcial. Verificar se irradiação com *laser* 660 nm aumenta a regeneração destes fígados. **Métodos:** 56 ratos Wistar foram divididos em quatro grupos de 14 animais: FTNP (fígado total não perfundido); FTP (fígado total perfundido); HPS (hepatectomia parcial a 70% *in situ*) e HPP (hepatectomia parcial a 70% perfundido *ex situ*). O tempo para estas análises teciduais foi de 0 e 24 horas. A perfusão hepática foi realizada com 250 ml de solução de preservação estática SPS-1. Em metade dos animais de cada grupo foi aplicado *laser* 660 nm. Foram realizadas análises utilizando-se um espectrofotômetro montado com dispositivos de *laser* emitindo comprimentos de onda em 405 nm e em 532 nm como fontes de excitação para captação de fluorescência. Para cada um foram realizadas quatro medidas do lobo lateral esquerdo. Feita a análise do tempo 0h (T0), sendo que nos grupos onde houve perfusão com SPS-1, esta leitura ocorreu imediatamente após a perfusão, e antes da aplicação de *laser* 660 nm. Nova leitura após 24 horas (T24). Em cada grupo de 14 animais, 7 tiveram o fígado irradiado com *laser* 660 nm em T0. Para a imunohistoquímica foi utilizado o anticorpo primário anti-Ki67. Análise e quantificação foram realizadas no microscópio óptico pela contagem do número de células imunomarcadas na objetiva de 40x (média 20 campos). **Resultados:** as análises de espectroscopia mostram a emissão de moléculas NADH, FAD e porfirinas, que emitem fluorescência nos comprimentos de onda de 464 nm, 535 nm e 630-690 nm, respectivamente. Os resultados de Ki67 inferem um aumento discreto ($p=0,02$) do marcador no subgrupo HPS com *laser* 660 nm, porém houve uma diminuição da regeneração hepática no subgrupo com *laser* 660 nm no grupo HPP. **Conclusão:** inferimos que a espectrometria de fluorescência pode ser

utilizada para a análise de características da atividade e viabilidade celular em tempo real. Também inferimos presença de atividade metabólica nas amostras preservadas hipotermicamente (após 24h da hepatectomia parcial), mesmo em condições adversas à regeneração. Quando associados fatores hepatotróficos à injúria tecidual, o *laser* (660 nm) fornecido ao tecido hepático aumentou a atividade metabólica (processo regenerativo). Em condições hipotérmicas, sem fatores hepatotróficos ou injúria tecidual, o fornecimento de *laser* 660 nm ao tecido hepático não incrementou a atividade metabólica do mesmo.

Palavras-chave: espectroscopia de fluorescência, regeneração hepática, hepatectomia parcial, hipotermia, laserterapia.

Abstract

Tsuge AT. **Study of laser fluorescence spectroscopy in livers of rats with hypothermic ischemia.** Thesis (PhD in Surgical Clinic). Ribeirão Preto School of Medicine University of São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introduction: After partial hepatectomy, the remaining liver presents a regenerative response, maintaining a percentage relationship with the host. There are no precise data in the literature on liver viability after tissue injury during hypothermic preservation. Spectroscopy can provide information about tissues through its ability to measure fluorescence, provided there is adequate stimulation. Spectroscopy techniques have been investigated as new methods for studying and analyzing tissue parameters. **Objective:** To evaluate, in an experimental model, the applicability of *laser* fluorescence spectroscopy in liver tissue from hepatectomies, using cell proliferation (assessed through Ki67 immunohistochemistry) as a control. Secondary objectives are to prove, through this technique, the viability of liver tissue after 24 hours of partial hepatectomy, under hypothermic conditions. Analyze the regeneration of the remaining liver after 24 hours of partial hepatectomy. Check whether irradiation with a 660 nm *laser* increases the regeneration of these livers. **Methods:** 56 Wistar rats were divided into four groups of 14 animals: FTNP (total non-perfused liver); FTP (total liver perfused); HPS (70% partial hepatectomy *in situ*) and HPP (70% partial hepatectomy perfused *ex situ*). The time for these tissue analyzes was 0 and 24 hours. Liver perfusion was performed with 250 ml of SPS-1 static preservation solution. Half of the animals in each group received a 660 nm *laser*. Analyzes were carried out using a spectrophotometer prepared with *laser* devices emitting wavelengths at 405 nm and 532 nm as excitation sources for fluorescence capture. For each one, four measurements were taken of the left lateral lobe. The time 0h (T0) was analyzed, and in the groups where there was perfusion with SPS-1, this reading occurred immediately after perfusion, and before the application of 660 nm *laser*. New reading after 24 hours (T24). In each group of 14 animals, 7 had their livers irradiated with a 660 nm *laser* at T0. For immunohistochemistry, the anti-Ki67 primary antibody was used. Analysis and quantification were carried out under an optical microscope by counting the number of immunostained cells under a 40x objective (average 20 fields). **Results:** spectroscopy analyzes show the emission of NADH, FAD and porphyrin molecules, which emit fluorescence at wavelengths of 464 nm, 535 nm and 630-690 nm, respectively. The Ki67 results infer a slight increase ($p=0.02$) of the marker in the HPS subgroup with 660 nm *laser*, however there was a decrease in liver regeneration in the subgroup with 660 nm *laser* in the HPP group. **Conclusion:** we infer that fluorescence spectrometry can be used to analyze characteristics of cell activity and viability in real time. We also inferred the presence of metabolic activity in samples preserved hypothermally (after 24 hours of partial hepatectomy), even in conditions adverse to regeneration. When hepatotrophic factors are associated

with tissue injury, the *laser* (660 nm) supplied to liver tissue increased metabolic activity (regenerative process). In hypothermic conditions, without hepatotrophic factors or tissue injury, the delivery of a 660 nm *laser* to the liver tissue did not increase its metabolic activity.

Keywords: fluorescence spectroscopy, hepatic regeneration, partial hepatectomy, hypothermia, *laser* therapy.

1. Introdução

O fígado tem extraordinária capacidade de regeneração diante de vários tipos de desafios, como as hepatites ou ressecções hepáticas parciais. A perda tecidual rapidamente desencadeia o processo regenerativo até que o peso original seja recuperado^{1,2,3}. Após hepatectomia parcial (HP) o fígado remanescente (FR) exhibe resposta regenerativa e mantém intrínseca relação percentual com o hospedeiro - recebendo pela veia porta, em regime de hipertensão portal, os fatores hepatotróficos, responsáveis pelo trofismo hepático^{1,2,3,4}.

Embora o termo regeneração seja comumente atribuído, é biologicamente incorreto, pois a resposta induzida pela ressecção de tecido hepático não é verdadeiramente regenerativa. Os lobos ressecados não crescem novamente. A restauração da massa hepática ocorre por compensação hiperplásica e hipertrófica nos lobos remanescentes, com conseqüente aumento em suas dimensões. Isso sugere que o crescimento do fígado é controlado por fatores funcionais e não anatômicos^{4,5}. Qualquer que seja a natureza desses fatores, eles parecem bastante precisos, desde que o crescimento cessa quando o fígado atinge seu peso original^{1,2,3,4}.

Após HP, o FR necessita adaptar-se hemodinamicamente, pois passa a receber todo o fluxo arterial e portal, que antes da HP irrigava todo o fígado^{5,6,7}. Isto causa sobrecarga metabólica no FR e parece engatilhar o processo regenerativo^{1,4,8,9}. Estudos com fluxo sanguíneo hepático mostram que após derivações porto-cavais, totais ou parciais, estas levam à hipotrofia do FR, retardando ou dificultando a regeneração hepática. Uma série de experimentos mostrou claramente a dependência do tecido hepático com relação ao sangue portal, sobretudo no que diz respeito aos hormônios, nutrientes, genes e fatores de crescimento oriundos do território esplâncnico^{1,2,3,4,10}.

O fígado pode, precisamente, regular seu crescimento e massa de acordo com estímulos que lhe são impingidos. As ressecções cirúrgicas de lobos hepáticos, bem como a perda de parênquima provocada por vírus ou lesão química irrompem a replicação de hepatócitos, mas sob um processo controlado, dado por apoptose simultânea^{1,2,11,12}. Essa particularidade é mostrada quando da ocorrência de déficit ou excesso de massa hepática, este último, exemplificado pelo chamado

“*large for size*” no transplante hepático, em que a capacidade do fígado recebido excede a demanda metabólica do receptor e há uma remodelação controlada do fígado^{2,5,6,7,8,9}.

Há muitas condições nas quais alterações da massa hepática, seja por aumento ou decréscimo, estão presentes. As deficiências são frequentemente provocados pela remoção cirúrgica do tecido e por perda de células (déficit funcional, sem perda de massa, necessariamente), causada por agentes químicos ou vírus. A transplantação de pequenos fígados para um grande receptor (transplante “*small for size*”) é, atualmente, um exemplo de deficiência hepática funcional^{5,6,7,8}. Outros exemplos de deficiência funcional envolvem necrose celular e tecidual sem alteração de massa, na falência hepática aguda e a extensa morte celular causada por agentes tóxicos e vírus^{1,3,4,5,6,7,8,9,10,12}.

O ponto decisivo para a regulação do crescimento hepático deve-se mais à razão entre a massa do órgão e a massa corpórea do que massa hepática *per se*^{1,2,6,13,14,15}. A otimização da razão indica que o fígado alcança um estado no qual realiza a quantidade de trabalho metabólico necessário para suprir as exigências do organismo. A regulação da massa hepática não se dá apenas pelo crescimento, e quando a massa excede a demanda metabólica funcional, o fígado perde massa para restaurar a razão adequada entre fígado/corpo através de apoptose hepatocítica^{4,11}. Em uma situação na qual a capacidade do fígado excede a necessidade do receptor, a massa hepática decresce até atingir o ponto de equilíbrio mais adequado^{2,4,12}. Isto mostra que o processo de regeneração hepática é dependente da relação fígado/hospedeiro.

Após injúria tecidual, a restauração da massa hepática ocorre por hiperplasia celular compensatória nos lobos remanescentes, com consequente aumento em suas dimensões. A regeneração do fígado tem sido exaustivamente estudada e descrita na literatura, mas vários aspectos necessitam ainda ser entendidos e estudados. Ao longo dos últimos anos diversos trabalhos da literatura têm sido publicados no sentido de analisar efeito de drogas, agentes físicos e doenças que possam interferir na regeneração hepática.

1.1. Regeneração hepática e fotobioestimulação

A palavra *laser* significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*¹⁶ e consiste de sistema que amplifica a intensidade de luz, produzindo um feixe intenso altamente direcionado, com o comprimento de onda específico, e características particulares de propagação.

Em 1972, começaram a ser descritos os efeitos biológicos do *laser* quando foi constatado o estímulo ao processo cicatricial em feridas cirúrgicas submetidas à irradiação *laser* de baixa potência. Denominou-se esse novo campo como fotobioestimulação¹⁸. A fototerapia com *laser* mostrou-se eficaz no tratamento de úlceras de membros inferiores, na neoformação vascular, proliferação de fibroblastos, reparo ósseo e regeneração de nervos^{16,18,19}, tendo também vasta aplicação em oncologia sob a terapia fotodinâmica^{20,21}.

Em meados da década de 90, Castro e Silva e cols. verificaram que a resposta regenerativa após a HP se encontrava exacerbada posteriormente a irradiação do fígado com *laser* hélio-neônio³³. Nos últimos anos, mais precisamente a partir dos anos 2000, foram publicados pelo grupo do Prof Castro e Silva, vários trabalhos relacionados com a interação da luz *laser* com o fígado em diversas situações, quer de efeito estimulador da regeneração hepática, quer de terapia fotodinâmica e de espectroscopia de fluorescência^{22,23,24,25,26,27,28,29,30,31}.

A fotobioestimulação baseia-se no nível mais sutil de interação da luz com tecidos, em que o fóton transmite sua energia a um composto fotossensível¹⁹. Pressupõe-se que o *laser* conduza a alterações conformacionais na estrutura dos citocromos dos hepatócitos, de modo que haveria um incremento na produção de ATP, expressando um aumento no metabolismo energético de fígado de ratos hepatectomizados^{33,36}.

Foi demonstrado que o *laser* de baixa potência tem a capacidade de elevar o índice mitótico e a função mitocondrial no remanescente hepático após ressecções parciais em ratos não cirróticos. De acordo com Godoy e cols, a aplicação de *laser* de baixa potência, ou baixa intensidade, utiliza fótons com comprimentos de onda localizados na região vermelha visível do espectro, ou na região do infravermelho próximo, os quais consistem em *lasers* diodos superluminescentes monocromáticos, com potência relativamente baixa (inferiores a 500 mW) e são utilizados nos tratamentos atérmicos, pois não provocam calor nos

tecidos biológicos³⁵. Nos estudos do Prof Castro e Silva e do Prof Zucoloto, foi relatado que o índice mitótico se eleva de 15-20 % nas hepatectomias sem aplicação de *laser*, para 50-55%, quando sucedidas de irradiação^{33,37,38}. O efeito da aplicação de *laser* de baixa potência sobre a regeneração hepática após HP estimula uma melhora significativa da regeneração hepática, favorável à formação de novos hepatócitos, células-tronco mesenquimais e angiogênese na regeneração em ratos^{38,39}.

Pesquisadores demonstraram que propriedades intrínsecas do tecido hepático estão fortemente correlacionadas com o espectro de fluorescência, na tentativa de avaliar atividade metabólica^{40,41}. Dentre essas propriedades, podemos destacar as biomoléculas como NADPH, flavinas, proteínas estruturais, aminoácidos com cadeias laterais aromáticas e porfirinas²⁵.

Croce e cols observaram que condições de preservação (com ausência de sangue) e hipóxia fria induzem a um aumento na amplitude do sinal, atribuído às alterações de NADPH, flavinas e coenzimas envolvidas no metabolismo energético⁴⁰. Atualmente, todos os métodos eficazes para preservação de órgãos para transplante baseiam-se na redução da temperatura como principal elemento protetor^{42,43,44,45,63}.

O resfriamento a uma temperatura entre 0° C e 4° C reduz as necessidades metabólicas e, estudos têm demonstrado que ocorre diminuição significativa na atividade enzimática. Porém, essa visão subestima a complexidade físico-química das interações metabólicas no órgão hipotérmico e os efeitos próprios do resfriamento sobre o órgão. A hipotermia pode provocar alterações na homeostase, diminuindo assim o volume celular^{42,45}.

De fato, existe uma variedade de fatores envolvidos no processo de regeneração hepática e vários são os métodos capazes de avaliar tal fenômeno, dentre eles, a determinação da massa hepática (peso do fígado), contagem de mitoses, estudo da síntese de DNA e métodos imunohistoquímicos para detecção de moléculas endógenas como *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), Ki67, entre outros. O Ki67 é um antígeno nuclear expresso nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. A avaliação imunohistoquímica de Ki67 é utilizada para quantificar a atividade celular proliferativa^{45,46}, e atualmente é considerada o padrão ouro para este fim.

1.2. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia tem o potencial de fornecer informações importantes sobre tecidos devido a capacidade de capturar e de mensurar a fluorescência emitida por componentes celulares alvo, uma vez que sejam estimulados da forma correta. Ultimamente, técnicas de espectroscopia óptica têm sido investigadas como novos métodos minimamente invasivos, ou mesmo não invasivos, para caracterização de tecidos ou para investigação e análise de diversos parâmetros teciduais⁴⁷.

Sinais de luz podem ser entregues e recolhidos através de fibras ópticas, e, os dados podem ser coletados e analisados em uma fração de segundo, permitindo então a análise do tecido “em tempo real”, sem a necessidade de biopsias ou similares. Sinais espectroscópicos podem indicar alterações bioquímicas e geralmente precedem as alterações morfológicas observadas na histologia⁴¹.

Em particular, a fluorescência fornece indícios sobre a superfície do órgão através de um feixe de luz. Ao incidir no órgão, esta luz é absorvida e parcialmente reemitida. A absorção ocorre simultaneamente com o espalhamento da luz, de modo que, à medida que a luz do feixe inicial se propaga pelo órgão, ela vai atingindo uma distribuição tecidual. Uma parte da luz absorvida é devolvida na forma de fluorescência⁴⁷.

Chance e *cols.* foram pioneiros em relatar uma relação estabelecida entre autofluorescência celular e processos metabólicos celulares - fluoróforos endógenos de células têm sido usados com sucesso como biomarcadores na determinação não destrutiva e em tempo real de características celulares⁴⁸.

Todas as células eucarióticas e procarióticas exibem uma fluorescência natural intrínseca (autofluorescência), e isto ocorre devido à presença de diferentes componentes estruturais celulares, como flavinas, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), aminoácidos aromáticos, lipofuscinas, produtos finais de glicação avançada e colágeno⁴⁹, todas moléculas com características fluorescentes.

Os espectros de autofluorescência celular abrangem a maior parte da faixa espectral visível ao olho humano, uma vez que, diferentes fluoróforos endógenos emitem diferentes comprimentos de onda, como as flavinas, NAD

e lipofuscina emitem luz verde, azul e laranja, respectivamente, quando excitados em comprimentos de onda apropriados^{46,47}.

As coenzimas NADPH e flavinas já foram consideradas principalmente para o monitoramento da autofluorescência da funcionalidade do fígado em transplantes e cirurgias. Os fluoróforos endógenos adicionais estão se tornando de interesse para a detecção precoce de doenças e danos hepáticos, considerando o aumento de patologias hepáticas graves e suas implicações tanto para a progressão da doença quanto para o transplante⁴⁶.

1.3. *Parâmetros das fontes de luz laser*

O *laser* é uma radiação eletromagnética com características próprias que a diferem de uma luz comum: possui um único comprimento de onda, com suas ondas propagando-se coerentemente no espaço e no tempo, carregando de forma colimada e direcional, altas concentrações de energia^{60,64}. Pode ter efeitos muito diferentes conforme o item 1.1, a depender de parâmetros de entrega de energia (fluência / dose de luz; potência óptica/ tempo de entrega; irradiância / intensidade / taxas de fluências). A extensão da interação entre os *lasers* e o tecido é geralmente determinada por fatores relacionados ao próprio *laser* e pelas características ópticas de cada tecido⁶⁰.

Alguns conceitos importantes^{66,67}:

- Fluência: energia depositada por área, ou distribuição superficial de energia (unidade: J/cm²).

- Potência óptica: taxa de entrega de energia, ou energia por tempo (unidades: J/s ou W).

- Irradiância: energia por área e por tempo, em potência por área, ou fluência por tempo (o mesmo que “taxa de fluência”) (unidades: W/cm² ou J/s.cm²).

O *laser* interage com a matéria viva por meio dos processos ópticos de reflexão, transmissão, espalhamento e absorção. Ao incidir no tecido biológico, parte da luz não penetra, sendo refletida. A porção de luz que penetra no tecido será dividida em uma parte que será absorvida, outra parte que será espalhada e ainda outra que será transmitida (fluorescência)⁶⁰.

Para aplicações biológicas, as taxas de entrega por área determinam se haverá fotobioestimulação, dano térmico ou outros efeitos. A escolha dos comprimentos de onda também é determinante, pois a absorção da luz pelas moléculas dependerá do comprimento de onda. Para que haja efeito clínico é necessário que a luz *laser* seja absorvida pelo tecido (densidade de energia, ou fluência). A luz que é refletida, transmitida ou dispersada não tem nenhum efeito. A absorção da luz do *laser* depende da quantidade de cromóforos presentes no tecido e da correspondência entre o comprimento de onda utilizado e as características de absorção daqueles cromóforos. Uma vez absorvida, a luz pode causar três efeitos básicos: o fototérmico, o fotoquímico e o fotomecânico. O efeito fototérmico ocorre quando o cromóforo absorve a energia com o comprimento de onda correspondente e a energia luminosa se converte em calor capaz de destruir o alvo atingido. No efeito fotoquímico ocorre uma reação química após a absorção da luz por agentes fotossensibilizantes (endógenos ou exógenos), sendo o princípio básico da terapia fotodinâmica. A expansão térmica pode ocorrer de forma extremamente rápida, capaz de produzir ondas acústicas e destruição fotomecânica do tecido que a absorveu^{65,68}.

Os *lasers* podem ser classificados de forma geral em: *lasers* de alta potência ou *lasers* cirúrgicos, que possuem, por exemplo, indicações cirúrgicas (corte, coagulação, cauterização) e efeitos de ablação (preparos cavitários odontológicos, prevenção); e *lasers* de baixa potência ou *lasers* terapêuticos, muito utilizados para fins terapêuticos e bioestimuladores, agindo principalmente como aceleradores em processos cicatriciais.

Quando trabalhamos com o *laser* em tecido vivo, buscamos resultados clínicos bastante específicos. A célula tem um determinado limiar de sobrevivência, que depende do tecido onde está localizada e também do seu estado fisiológico. Se utilizarmos o *laser* com a intenção de respeitar esse limiar de determinada célula, oferecemos uma baixa intensidade de energia, que será utilizada por ela de maneira a estimular sua membrana e as membranas de suas mitocôndrias. Dessa forma estaremos induzindo essa célula à biomodulação, ou seja, a célula trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada. Nesse caso o *laser* trabalhará em baixa densidade de potência. Esse tipo de terapia passou a ser

chamado de laserterapia, empregando o *laser* de baixa intensidade para fins terapêuticos, obtendo efeitos fotoquímicos⁶⁹.

Deste modo, *lasers* de fotobioestimulação e de diagnósticos tem potências baixas (e portanto, acabam usando irradiâncias baixas ou tempos curtos, que resultam numa entrega de energia insuficiente para danos relevantes), sendo capazes de induzir a geração de fluorescências ou efeitos de fotoestimulação em organelas e moléculas, sem induzir efeitos térmicos ou fotoablativos, que causariam danos ao tecido, como é o caso dos *lasers* cirúrgicos, que costumam emitir luz na região do infravermelho médio (alta potência / irradiância), enquanto *lasers* de fotobioestimulação e diagnóstico óptico geralmente emitem luz na região do espectro visível ao olho humano e infravermelho próximo.

Neste estudo, utilizamos *lasers* de baixa potência. Dentro dos *lasers* de baixa potência, torna-se importante ressaltar que os efeitos do *laser* terapêutico (fotobioestimulação) são muito diferentes dos efeitos dos *lasers* diagnósticos (excitação de fluorescência). No primeiro, *laser* terapêutico, trata-se de uma modalidade de fornecimento de energia para células, enquanto que no segundo, *laser* diagnóstico, o objetivo é estimular a fluorescência de moléculas específicas com o intuito de se captar e analisar a fluorescência das mesmas. Vale lembrar que os *lasers* na faixa do vermelho, no comprimento de onda de 632 a 780 nm, não são capazes de produzir danos aos tecidos, como mutações e carcinogênese^{66,70}, e o comprimento de onda usado neste estudo para fornecimento de energia foi de 660 nm, que corresponde a essa faixa espectral.

2. Objetivo

Avaliar, em modelo experimental, a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência a *laser* no estudo do tecido hepático proveniente de hepatectomias, utilizando-se a proliferação celular (avaliada através do padrão ouro – imunohistoquímica de Ki67) como controle.

2.1. Objetivos secundários

2.1.1. Comprovar, através desta técnica, a viabilidade do tecido hepático após 24h de hepatectomia parcial, em condições hipotérmicas.

2.1.2. Analisar a regeneração do fígado remanescente após 24 horas de hepatectomia parcial.

2.1.3. Verificar se irradiação com luz *laser* aumenta o processo de regeneração destes fígados.

3. Material e método

3.1. Ambientação da pesquisa

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA - FMUSP, vide ANEXO). Todos os procedimentos envolvendo a experimentação foram realizados de acordo com princípios éticos estabelecidos internacionalmente (NRC, 1996). Os animais de todos os grupos foram mantidos e sacrificados no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram colhidas as amostras biológicas para estudos posteriores.

3.2. Casuística

Nesta pesquisa foram estudados ratos da raça Wistar, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina – USP, machos pesando cerca de 300 g. Os mesmos foram acondicionados em gaiolas transparentes de polipropileno com cobertura de arame galvanizado, medindo 41x34x16 cm, mantidos à temperatura ambiente, sob ciclo “claro-escuro” de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração padrão para ratos de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda) e receberam água à vontade.

A amostra foi calculada conforme o método de Kelley e Maxwell⁵⁰, onde 56 ratos foram divididos em quatro grupos de 14 animais. De cada grupo, 7 animais receberam tratamento com *laser* (fotobioestimulação no comprimento de onda 660 nm, conforme descrito na seção 3.6), e outros 7 não receberam. Os grupos foram classificados de acordo com o procedimento cirúrgico pré-estabelecido (Tabela 1):

- 1. Grupo FTNP - Controle (Fígado Total Não Perfundido):** composto por 14 ratos, divididos em 2 grupos de 7 animais (com *laser* e sem *laser*). Foi realizada hepatectomia total; os fígados foram acondicionados em frascos plásticos com 30 ml da solução SPS-1 a 4°C por 24 horas;
- 2. Grupo FTP (Fígado Total Perfundido):** composto por 14 ratos, divididos em 2 grupos de 7 animais (com *laser* e sem *laser*). Foi realizada perfusão hepática com solução SPS-1 a 4°C, e posterior hepatectomia total. Em seguida, os fígados foram acondicionados em frascos plásticos com 30 ml da solução SPS-1 a 4°C por 24 horas;

- 3. Grupo HPP (Hepatectomia Parcial Perfundido - *ex situ*):** composto por 14 ratos, divididos em 2 grupos de 7 animais (com *laser* e sem *laser*). Foi realizada perfusão hepática com solução SPS-1. Após, foi realizada hepatectomia parcial e o lobo lateral esquerdo de cada animal (o que corresponde a 30% do fígado desses animais) foi acondicionado em frascos plásticos com 30 ml de solução SPS-1 a 4°C por 24 horas;
- 4. Grupo HPS (Hepatectomia Parcial Não Perfundido - *in situ*):** composto por 14 ratos, divididos em 2 grupos de 7 animais (com *laser* e sem *laser*). Foi realizada hepatectomia parcial, restando apenas o lobo lateral esquerdo nos animais (o que corresponde a 30% do fígado desses animais). Os ratos foram mantidos vivos por 24 horas.

Tabela 1. Disposição da casuística do estudo.

	FTNP	FTP	HPS	HPP
SEM <i>laser</i> (660 nm)	7 ratos	7 ratos	7 ratos	7 ratos
COM <i>laser</i> (660 nm)	7 ratos	7 ratos	7 ratos	7 ratos
TOTAL	14 ratos	14 ratos	14 ratos	14 ratos

3.3. Anestesia

Todos os animais foram submetidos à anestesia geral com mistura de xilazina 20 mg/ml (Dopaser®, Gepec, Brasil) e Cetamina 50 mg/ml (Ketalar® Pfizer, Brasil) na dose de 15 unidades/100 g de peso, administrada por via intraperitoneal.

3.4. Procedimentos cirúrgicos

A HP a 70% foi feita conforme Higgins e Anderson⁵¹. O procedimento cirúrgico foi iniciado a partir de uma incisão abdominal na linha média. Uma vez com o fígado exposto, para cada animal foi coletado um fragmento de tecido hepático do lobo lateral esquerdo para análise histológica. Estes foram preservados em formalina 10% tamponada (Figura 1).



Figura 1. A – Início do procedimento cirúrgico (aparando pelos); B – Incisão mediana e abertura da cavidade abdominal; C – Hepatectomia a 70% propriamente dita, ligadura de pedículo hepático.

Em seguida, a perfusão hepática com a solução SPS-1 foi feita nos grupos FTP e HPP por pressão hidrostática, sendo iniciada com acesso torácico por via diafragmática, seguido de punção do ventrículo esquerdo com cateter sobre agulha (Abocath®, Becton Dickinson Ind. Cirúrg. Ltda, Brasil), calibre 22, conectado a uma coluna líquida com 250 ml de solução SPS-1, de 130 cm de altura, o que corresponde a pressão de aproximadamente 90 mmHg⁴¹. Após a punção, foi feita a abertura da veia cava infra-hepática e, por fim, a perfusão propriamente dita (Figura 2).

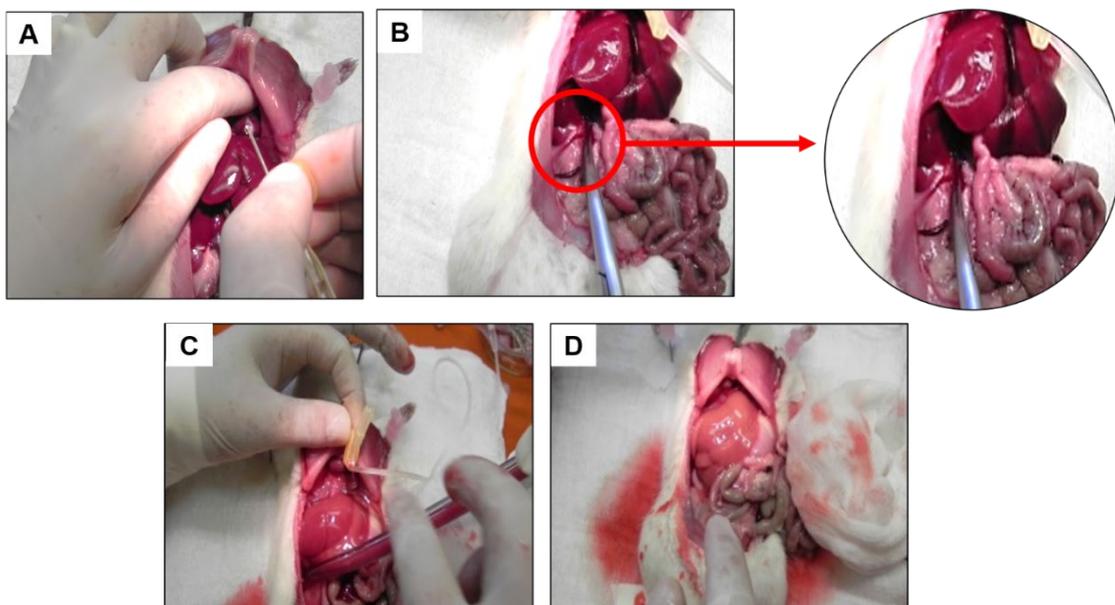


Figura 2. A – Momento da punção do ventrículo esquerdo; B – Secção da veia cava infra-hepática; C – Perfusão propriamente dita com consequente troca do sangue hepático pela solução SPS-1; D – Fígado totalmente perfundido com SPS-1: observa-se a ausência de sangue pela alteração de coloração.

Uma vez totalmente trocado o sangue hepático por SPS-1, a perfusão foi interrompida e a hepatectomia total ou parcial a 70%, realizada. Quando realizada hepatectomia parcial, somente o lobo lateral esquerdo foi preservado para o estudo (Figura 3). Durante a operação, coágulos sanguíneos foram completamente limpos com gaze, e realizada hemostasia rigorosa. Utilizou-se bisturi elétrico para cauterização quando necessário, fato que não inviabilizou as análises. Para o grupo HPS especificamente, a sutura da incisão mediana procedeu-se com fio cirúrgico nylon 4-0.

Para os grupos FTNP, FTP e HPP, os órgãos coletados foram armazenados a temperatura de 4°C em frascos plásticos com 30 ml de solução SPS-1 por 24 horas (Figura 4).

Os animais que foram mantidos vivos por 24 horas, receberam tramadol como medicamento analgésico pós-operatório e foi aplicada solução antisséptica iodopovidona 10% sobre a ferida cirúrgica.

Para eutanásia desses animais, foi utilizada a mistura de xilazina (Dopaser®, Gepec, Brasil) e cetamina em dose letal (dose dobrada – 40 mg/ml).

Ao completar-se 24 horas da hepatectomia, os fígados mantidos *ex situ* e *in situ* foram novamente analisados, e coletados novos fragmentos de tecido hepático (lobo lateral esquerdo) para análise histológica (também preservados em formalina 10% tamponada).

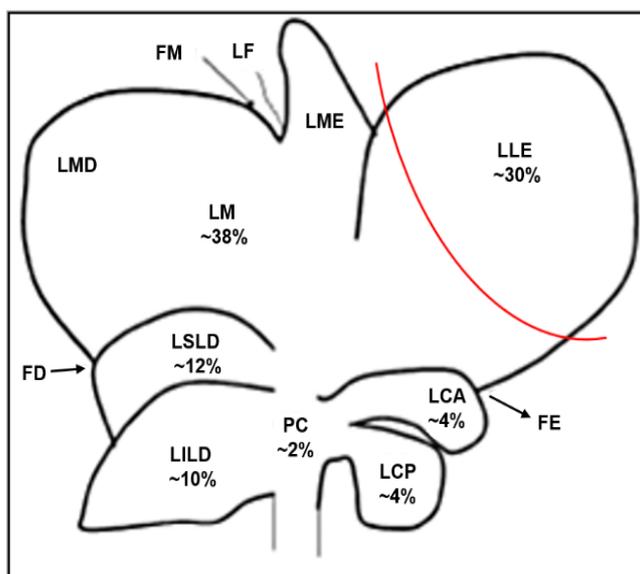


Figura 3. Desenho esquemático da anatomia do fígado do rato Wistar, onde cada lobo tem seu tamanho relativo apresentado. **PC**, processo caudal; **LCA**, lobo caudado anterior; **LCP**, lobo caudado posterior; **LSLD**, lobo superior lateral direito; **LILD**, lobo inferior lateral direito; **LM**, lobo mediano; **LMD**, porção direita do lobo mediano; **LME**, porção esquerda do lobo mediano; **LLE**, lobo lateral esquerdo; **FM**, fissura mediana; **FE**, fissura esquerda; **FD**, fissura direita; **LF**, ligamento falciforme. *Fonte Martins e Neuhaus, 2007.

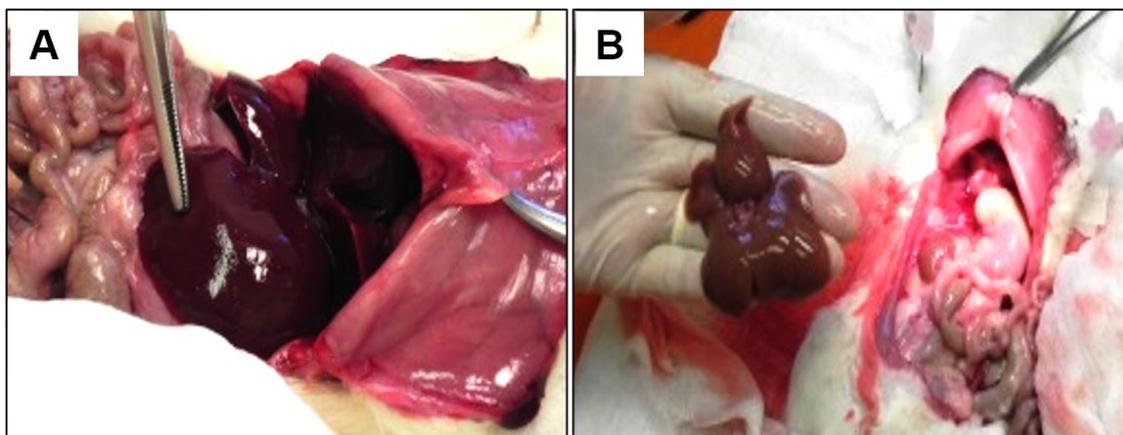


Figura 4. A – Momento da hepatectomia total; B – Hepatectomia total propriamente dita, aspecto da anatomia do fígado de rato Wistar.

Os diagramas 1 e 2 exemplificam, de forma sintética, a sequência dos eventos descritos neste item 3.4:

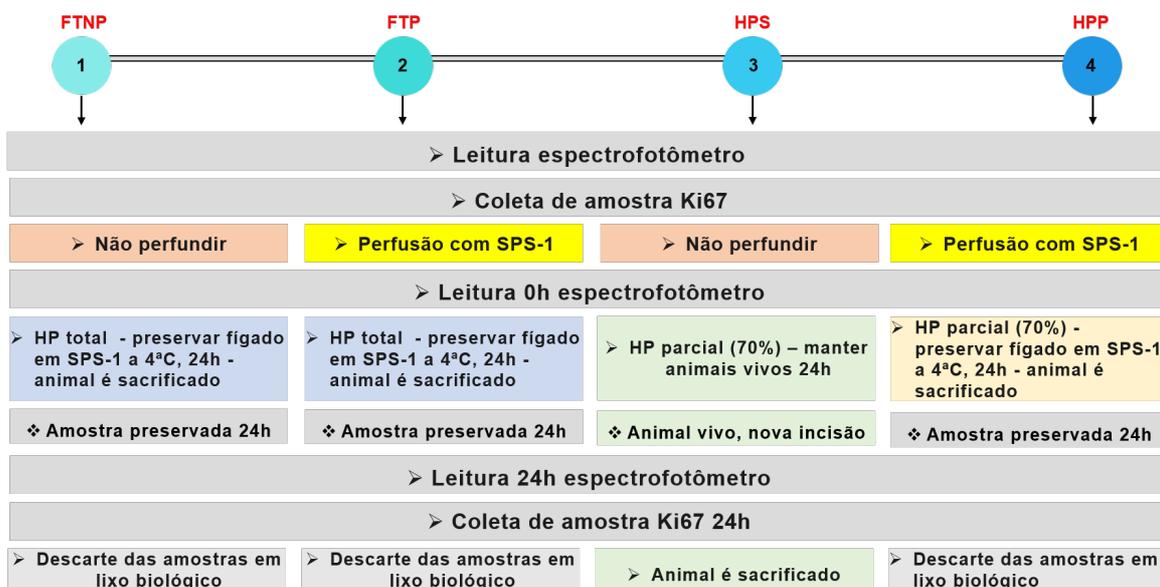


Diagrama 1. Quadro esquemático da sequência de procedimentos realizados nos animais de todos os grupos, **SEM** o fornecimento de energia sob a forma de *laser* 660 nm.

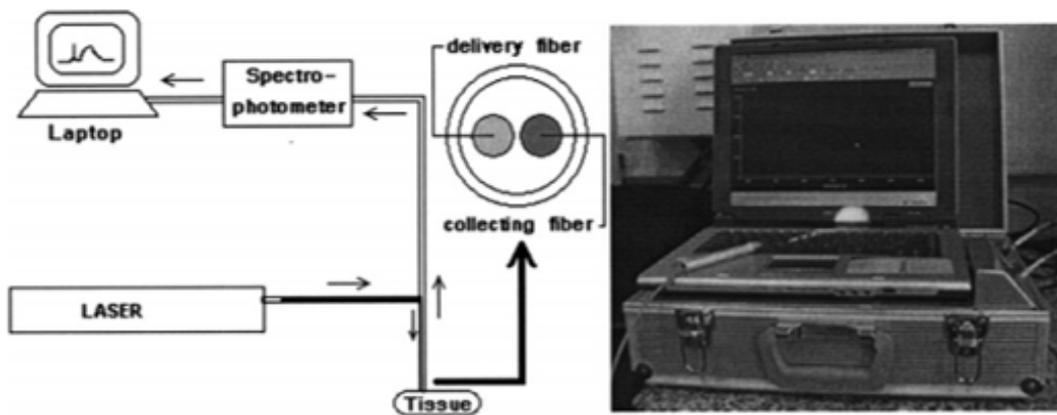


Figura 5. Imagem ilustrativa do Espectrofotômetro de Fluorescência (Castro-e-Silva *et al*, 2008).

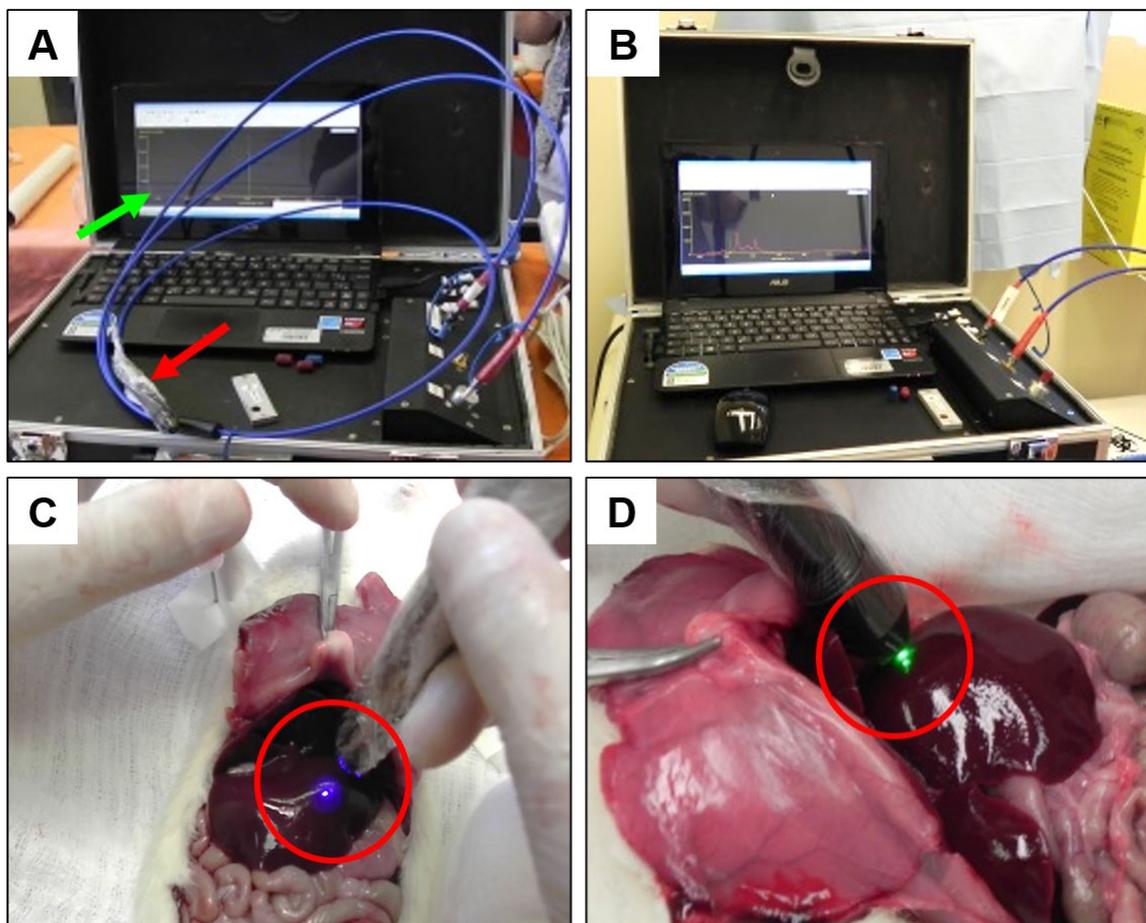


Figura 6. A – Foto do espectrofotômetro de fluorescência utilizado nas análises do estudo - sonda óptica utilizada para a coleta da fluorescência emitida (seta vermelha), laptop para visualização dos gráficos de fluorescência emitidas (seta verde); B – Laptop mostrando espectro proveniente da leitura da captação da luz emitida; C - Momento da análise com luz 405 nm (violeta); D – Momento da análise com luz 532 nm (verde).

Um filtro de passa-alta de 550 nm (OGG550, Schott, EUA) foi usado para remover a luz retroespalhada antes de entrar no espectrofotômetro para excitação em 532 nm, e um em 450 nm para excitação em 405 nm.

Foram realizadas análises espectrofotométricas em dois comprimentos de ondas diferentes, a primeira de 405 nm (violeta) e a segunda de 532 nm (verde). Para cada comprimento de onda foram realizadas quatro medidas do lobo lateral esquerdo, totalizando 8 análises. Para cada análise unitária, foi escolhido um ponto arbitrário no lobo lateral esquerdo, e a partir de então, esses quatro pontos se repetiram em todas as análises (Figura 7). Realizamos uma leitura preliminar, denominada de Controle Interno, ou seja, a análise dos fígados antes da injúria tecidual. Em seguida, procedemos à coleta das amostras para imunohistoquímica. Dando prosseguimento, iniciamos as análises espectrofotométricas propriamente ditas deste estudo. Para isto, a primeira análise, denominada T0, foi executada da seguinte maneira: nos grupos que não receberam energia sob irradiação com *laser* 660 nm, a análise foi executada logo após a realização do Controle Interno. Nos grupos que sofreram perfusão com SPS-1, esta leitura T0 ocorreu imediatamente após a perfusão (cerca de 5 a 10 minutos após o início da perfusão, tempo necessário para que ela se completasse totalmente), e antes da aplicação do *laser* 660 nm. Em cada grupo de 14 animais, 7 tiveram o fígado irradiado com *laser* 660 nm em T0 (vide item 3.6).

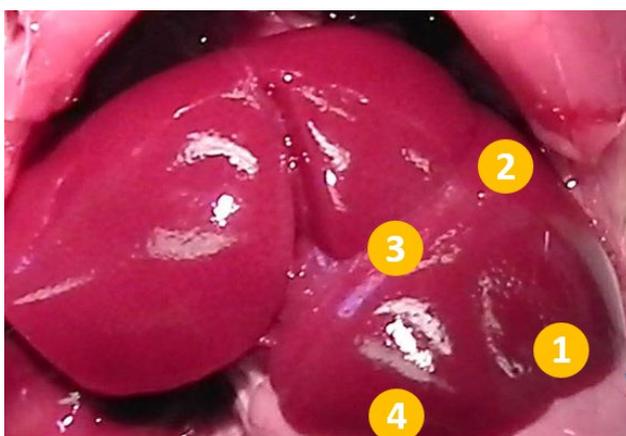


Figura 7. Foto esquemática mostrando os pontos de leitura de espectrofotometria deste estudo. LLE – Lobo Lateral Esquerdo.

LLE

Após 24 horas do experimento, foram feitas novas análises de espectrofotometria, nos mesmos moldes, e em sequência nova coleta de amostras para imunohistoquímica. Estas análises espectrofotométricas foram denominadas T24.

Todas as análises espectrofotométricas estão agrupadas no Diagrama 3:

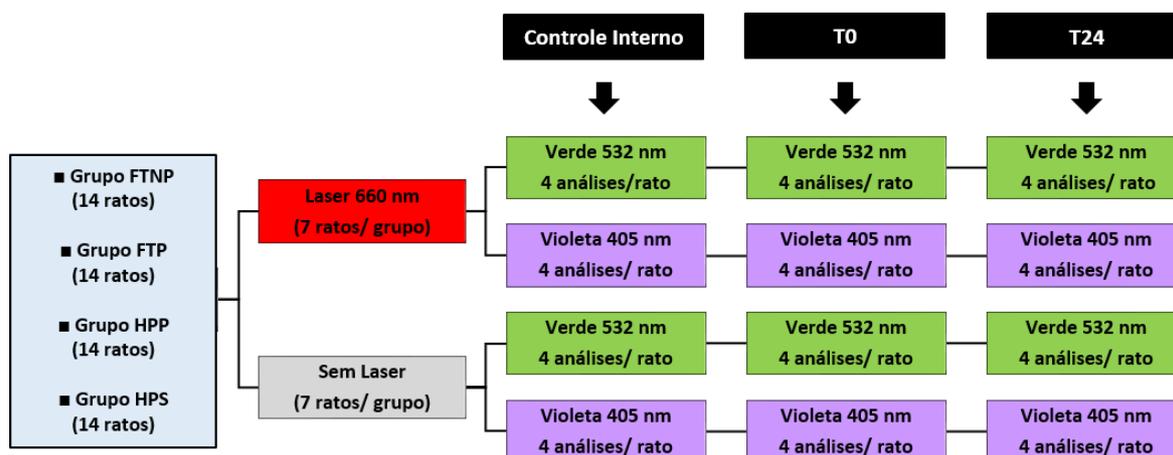


Diagrama 3. Quadro esquemático da quantidade e sequência de análises espectrofotométricas realizadas nos animais de todos os grupos de estudo – Controle Interno (imediatamente após abertura de cavidade abdominal); – Tempo 0 (T0), imediatamente após perfusão com solução SPS-1; – Tempo 24 horas (T24) coleta após 24h.

3.6. Fotobioestimulação

Para o fornecimento de energia às células hepáticas (fotobioestimulação), foi utilizado o aparelho *LASER CW* (modelo BDP 660, classe IIIb, de emissão contínua de luz visível, de baixa intensidade, com meio ativo semicondutor e transdutor de fibras ópticas fundidas com 80 mm de comprimento e diâmetro de 7 mm, produzido por M.M. Optics LTDA - São Carlos, São Paulo). O comprimento de onda usado foi o de 660 nm (luz vermelha, dentro do espectro visível), de alta penetrabilidade no tecido biológico e regulado na potência de 40 mW, com dose de irradiação de luz total de 30 J/cm².

Para a irradiação propriamente dita dos fígados, as aplicações foram feitas em 5 pontos distintos do lobo lateral esquerdo, cada aplicação com duração de 1 minuto, num total de 5 minutos de duração por sessão. Para tal, posicionamos a superfície da extremidade distal do transdutor de aplicação em contato suave com a superfície hepática^{37,38}, como mostra a Figura 8.

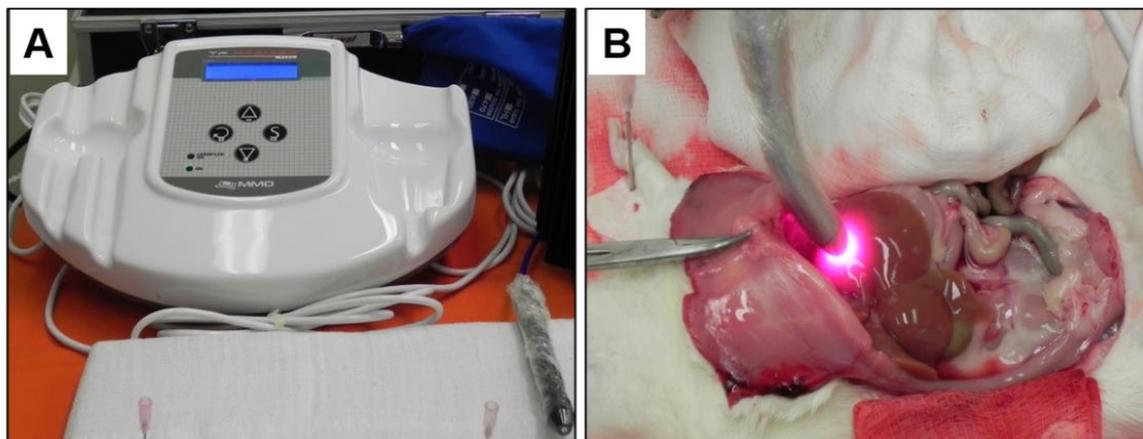


Figura 8. A – Foto do aparelho gerador de luz laser; B – Momento de irradiação do fígado com *laser* para fornecimento de energia às células hepáticas.

Nos grupos que receberam *laser*, as aplicações ocorreram em T0, em seguida a execução das análises espectrofotométricas. Uma vez fornecida a energia às amostras de fígados, estes últimos foram imediatamente acondicionados nos frascos com SPS-1 e preservados em hipotermia por 24 horas, com exceção das amostras do grupo HPS, que permaneceram em seus respectivos hospedeiros.

3.7. Técnica de imunohistoquímica (análise de Ki67)

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em álcool de diferentes concentrações (100%, 95%, 70%) e água. A recuperação antigênica foi realizada com tampão Citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Dako Cytomation - California, Ref. S2800).

Após a lavagem do material em água, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio 6%, com 2 banhos de 8 minutos, à temperatura ambiente. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com CAS Block (Invitrogen, Ref. 008120) por 10 minutos à temperatura ambiente. De

acordo com a padronização e orientação do fabricante, o anticorpo primário anti-Ki67 (Abcam ref. SP6 – ab 16667/ Rabbit Monoclonal) foi diluído 1:100 em Antibody Diluent (Invitrogen Ref. 3218) e incubado durante 60 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida.

A seguir, após lavagem em PBS pH 7.4, foi realizada a detecção do antígeno/anticorpo utilizando polímero MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection System (BIOCARE Medical-BRI4012).

Na revelação das reações utilizamos o substrato cromógeno DAB, (Dako Cytomation - California, Ref. Nº K3468) e a contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (Easy Path, Ref. K3468).

As lâminas com as reações foram desidratadas em álcool de diferentes concentrações (70%, 95% e 100%), diafanizadas com xilol e montadas com lamínulas e resina sintética (Easy Path, Ref. 51-05041) para análise dos fragmentos (Figura 9).

A análise e a quantificação foram realizadas no microscópio óptico pela contagem do número de células imunomarcadas na objetiva de 40x (em média 20 campos), sendo os resultados expressos em células/mm² e para isso foi dividido o número médio de células pelo valor de conversão 0,159 mm², que representa a área do campo da objetiva de 40x.

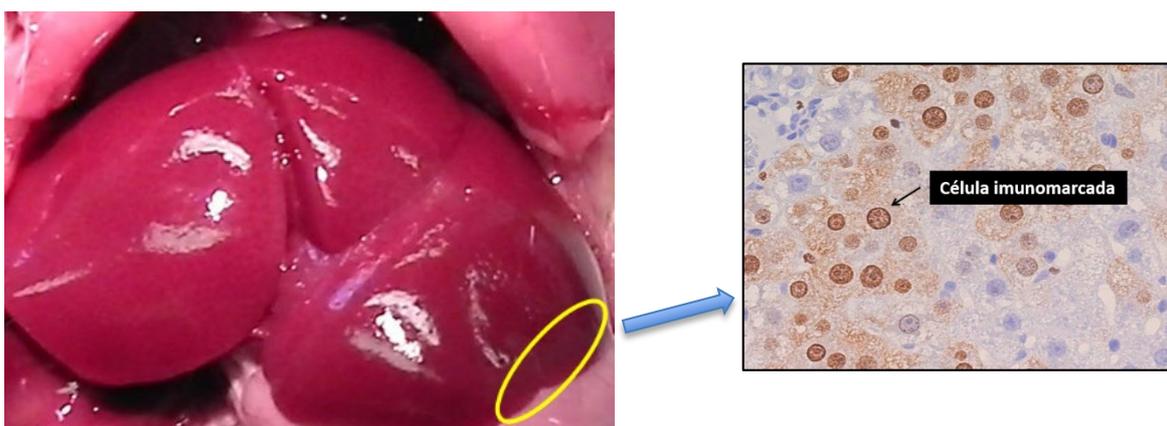


Figura 9. Detalhe do local da coleta das amostras de fígado (lobo lateral esquerdo) para análise imunohistoquímica; fotomicrografia de hepatócitos imunomarcados com anticorpo anti-Ki67.

3.8. Compilação dos dados da espectroscopia de fluorescência

Um laptop acoplado ao espectrofotômetro e o software OOIBase32.exe (Ocean Optics) foram usados para adquirir e salvar os dados do espectro. O sistema de espectroscopia foi alojado em um estojo de câmera convencional, permitindo sua portabilidade. A sonda de investigação foi protegida com uma película plástica não fluorescente esterilizada e colocada suavemente em contato com o tecido alvo. O espectro de fluorescência foi coletado em uma medição não invasiva; apenas os locais dos tecidos superficiais foram investigados; portanto, nenhum efeito do tipo volumétrico pode ser revelado por esse método. Em modelos experimentais, a profundidade de excitação medida foi inferior a 1 mm. Os dados resultantes foram exportados para um software de análise, o OriginPro 8, para tabulação, normalização dos resultados e obtenção dos gráficos (Figura 10).

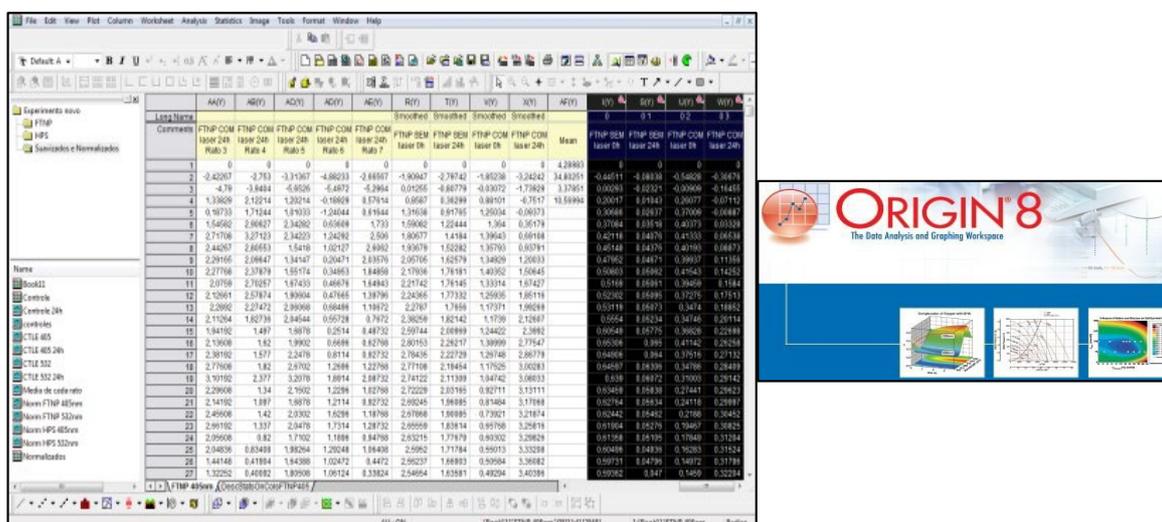


Figura 10. Imagens ilustrativas do programa utilizado para análise dos dados obtidos a partir da leitura com o espectrofotômetro. A imagem à esquerda demonstra os valores dos comprimentos de onda tabulados para análise posterior.

3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 6.0. As variáveis foram expressas em mediana e intervalo interquartil. Foram feitos testes de normalidade entre as variáveis onde nenhum dado se manteve paramétrico. Para análise entre pares foi realizado o teste Mann - Whitney.

Consideramos $p < 0,05$ estatisticamente significante.

4. Resultados

4.1. Peso dos animais

Os animais mostraram um padrão homogêneo quanto ao peso. Os dados de média \pm DP estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Média \pm DP do peso dos animais de cada grupo, em gramas.

	FTNP	FTP	HPS	HPP
SEM laser	408 \pm 22	362 \pm 0,1	354 \pm 22	316 \pm 12
COM laser	397 \pm 16	312 \pm 7	339 \pm 14	332 \pm 10

4.2. Análises espectrofotométricas

Consideramos como grupo Controle Interno a análise preliminar de todos os animais, antes de T0. Este grupo serviu como parâmetro de controle interno das leituras realizadas pelo espectrofotômetro.

A análise do grupo Controle Interno mostrou diferenças quanto à intensidade de emissão de fluorescência. Observaram-se dois picos intensos entre 450 – 650 nm, quando excitados no comprimento de 405 nm, vide figura 11.

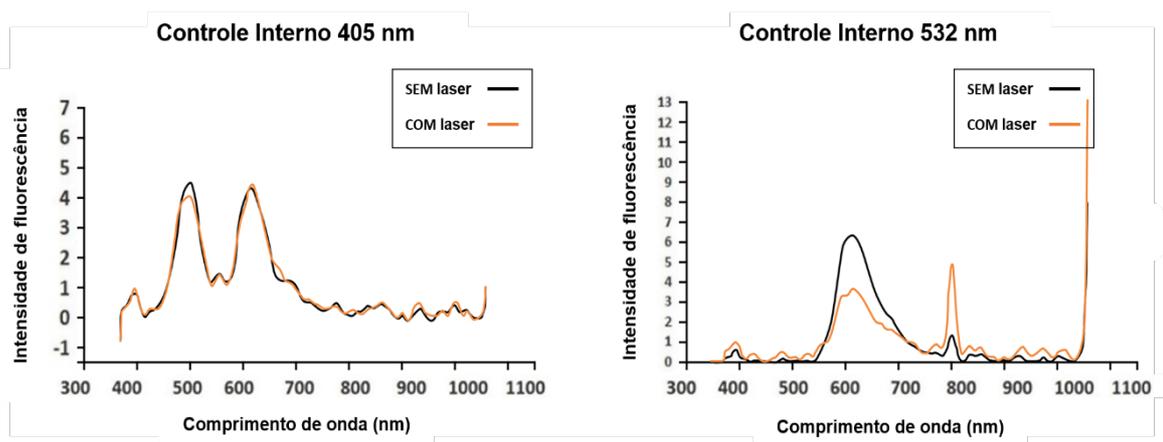


Figura 11. Gráficos da análise espectrofotométrica de **Todos os Grupos** nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com Laser e Sem Laser.

Os espectros de fluorescência, nessa faixa espectral, refletem alterações relacionadas a eventos biológicos no tecido uma vez que, moléculas como NADH, FAD e as porfirinas, emitem fluorescência em comprimento de 464 nm, 535 nm, e 630-690 nm, respectivamente – Figuras 12, 13, 14 e 15. Especificamente no comprimento de onda 532 nm, observa-se um pico em 800 nm; trata-se de um harmônico do laser de excitação, e não fluorescência captada, portanto não interfere neste estudo.

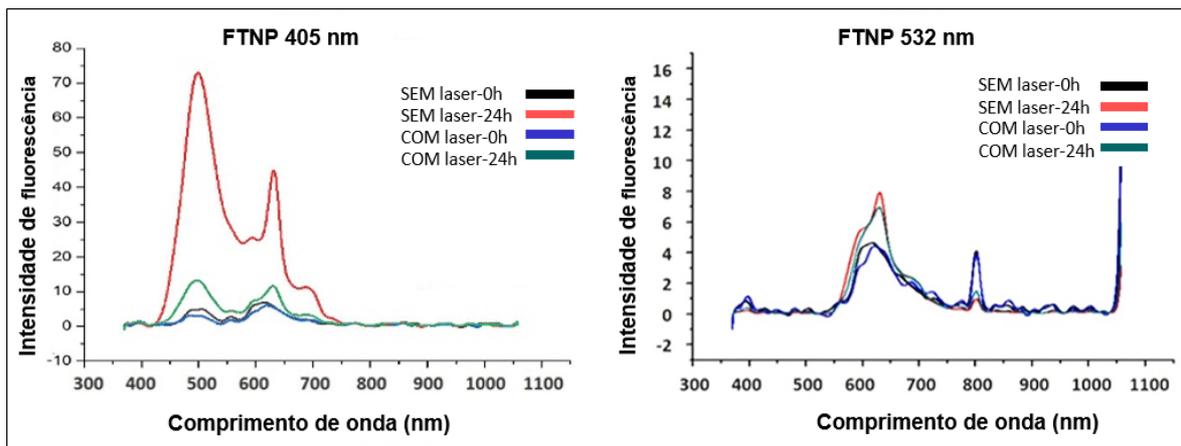


Figura 12. Gráficos da análise espectrofotométrica do **Grupo FTNP** nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com *Laser* e Sem *Laser*.

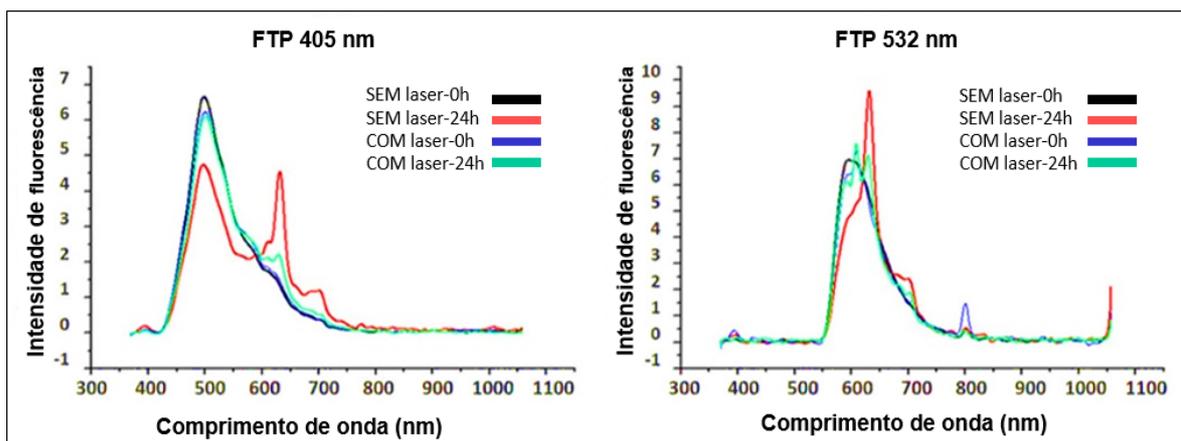


Figura 13. Gráficos da análise espectrofotométrica do **Grupo FTP** nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com *Laser* e Sem *Laser*.

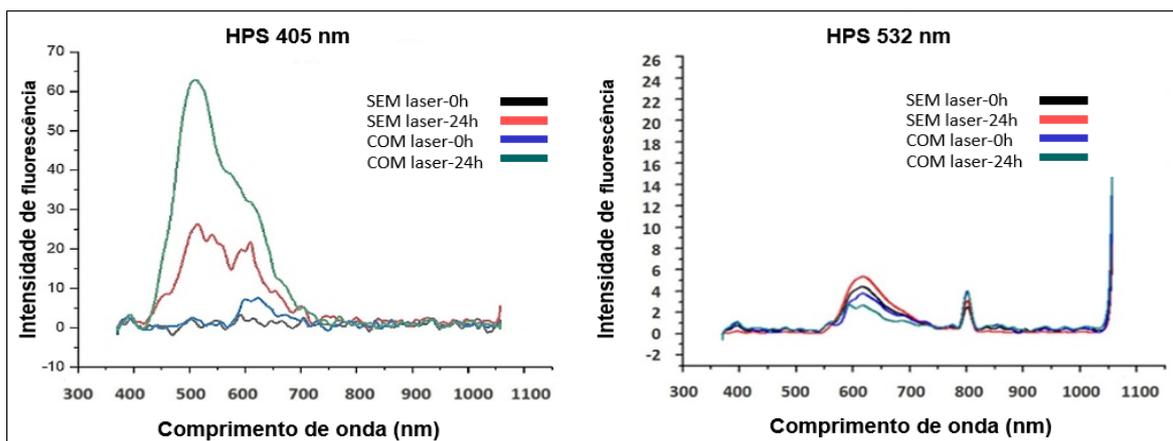


Figura 14. Gráficos da análise espectrofotométrica do **Grupo HPS** nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo lateral esquerdo dos animais, Com Laser e Sem Laser.

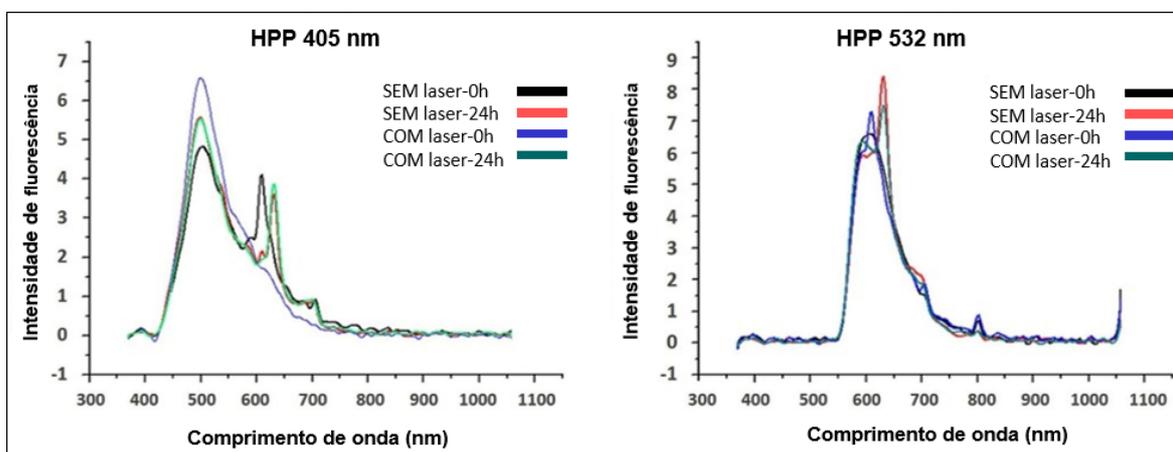


Figura 15. Gráficos da análise espectrofotométrica do **Grupo HPP** nos comprimentos de onda 405 nm e 532 nm. Espectros de fluorescência do lobo hepático esquerdo dos animais, Com Laser e Sem Laser.

4.3. *Análise imunohistoquímica (Ki67) e comparativo com análise espectrofotométrica*

O Ki67 é um antígeno nuclear associado com a proliferação celular, encontrado em todo o ciclo celular (fases G1, S, G2, M) e ausente em G0. Atualmente a imunohistoquímica de Ki67 é a análise padrão ouro na identificação de proliferação celular e resposta regenerativa.

Assim, realizamos análises para avaliar a marcação de Ki67 nos grupos para verificar se houve proliferação de hepatócitos 24 horas após injúria tecidual.

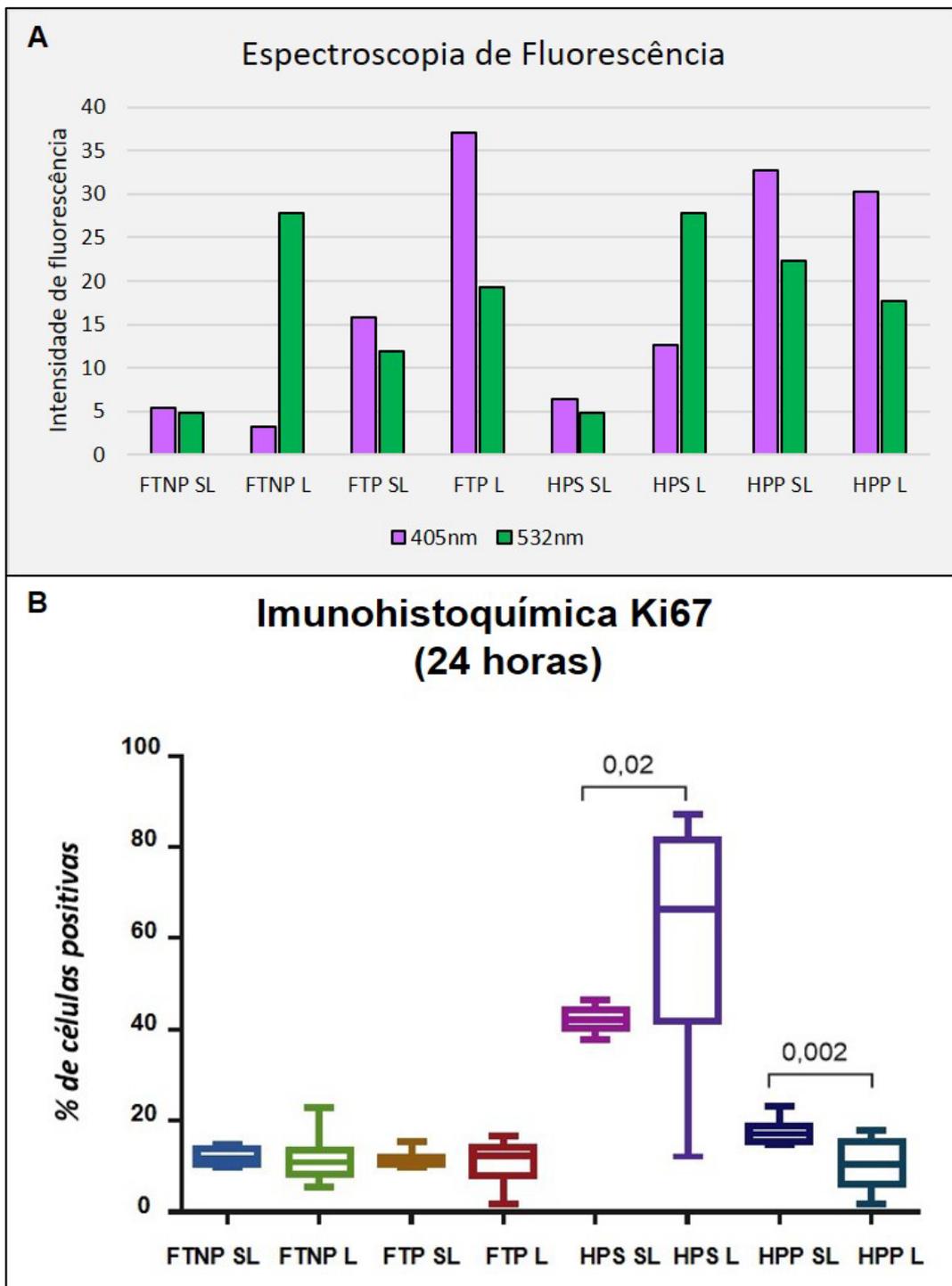


Figura 16. A - compilação das análises de espectrofotometria de fluorescência de todos os grupos, nos comprimentos de onda de 405 nm e 532 nm. B – comparativo das análises imunohistoquímicas de Ki67 de todos os grupos (Grupos SL – Sem *Laser*; Grupos L – Com *Laser*).

O gráfico da Figura 16A representa um compilado de todas as análises de espectroscopia de fluorescência, e foi gerado a partir dos mesmos dados (cálculo das áreas) das Figuras 10, 11, 12 e 13, para um melhor efeito comparativo entre os grupos. Todos os grupos foram inseridos nesse gráfico, incluindo tanto os grupos que não receberam energia na forma de *laser* (Sem *Laser* – SL), quanto os que receberam *laser* (Com *Laser* - L), no comprimento de onda 660 nm. Já o gráfico da Figura 16B representa um compilado de todas as análises de imunohistoquímica Ki67, de todos os grupos, incluindo tanto os grupos que não receberam energia na forma de *laser* (Sem *Laser* – SL), quanto os que receberam *laser* (Com *Laser* - L), no comprimento de onda 660 nm. Também foram aplicadas as análises estatísticas entre grupos, com significância estatística $p < 0,05$. Especificamente no grupo HPS 24h L, houve um animal “outsider”, demonstrado pela discrepância em sua análise.

5. Discussão

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica não invasiva que vem sendo cada vez mais utilizada como potencial técnica para caracterização tecidual, com finalidade diagnóstica e terapêutica^{52,53,54}.

Há várias biomoléculas envolvidas, tanto nos processos metabólicos quanto na organização histológica das células e tecidos - que são caracterizadas por suas propriedades de fluorescência, podendo ser exploradas para obter informações sobre as condições morfofuncionais⁵⁵.

A absorção da luz *laser* pelos tecidos pode resultar em quatro processos: fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico. Isto se deve ao grande número de efeitos físicos que esses processos ocasionam; eles podem ser subdivididos de acordo com a sua manifestação clínica⁵⁶.

Moléculas como NADH e FAD podem fornecer informações sobre *status redox* de células e tecidos, já que são coenzimas importantes na atividade metabólica celular^{34,57}. As porfirinas, que correspondem a compostos que possuem anéis orgânicos heterocíclicos, aparecem como unidades centrais de diversas moléculas, como a hemoglobina, clorofila e vitamina B12, possuindo altas taxas de fotoatividade e fotoreatividade⁵⁸. Os derivados porfíricos, provenientes da biossíntese do heme do ferro, presente nas hemácias, apresentam comprimento de onda de excitação a 400 – 450 nm, emissão em 630 – 690 nm, dando-lhes a característica natural do seu pigmento de cor púrpura.

A constituição bioquímica tecidual e sanguínea é a grande responsável pelas características espectrais da fluorescência, dado que o sangue é um grande absorvedor de luz verde (532 nm), ou seja, enquanto a amplitude tem grande relação com a absorção e penetrabilidade, a forma do espectro (picos e largura) tem a ver com a constituição química do órgão estudado^{54,59,63}.

Quando comparamos as análises realizadas pelo espectrofotômetro nos grupos de estudo, “Com *Laser*” e “Sem *Laser*”, há uma sobreposição das curvas da intensidade de fluorescência, em ambos os comprimentos de onda utilizados na metodologia (405 nm – 532 nm). Todos os grupos mostraram faixa espectral entre 400 nm – 600 nm, com pico de intensidade de absorção de luz mais elevado no tempo de 24 horas, nos animais irradiados e não irradiados, com luz *laser*. Isto

corroborar dados presentes na literatura, já que moléculas de DNA e proteínas são os principais cromóforos absorventes de UV, de 200 nm à 400 nm no tecido biológico, inferindo atividade celular ativa, vide figuras 12, 13, 14 e 15. A faixa espectral de absorção entre 400 nm a 600 nm (luz visível) está relacionada com oxiemoglobina, hemoglobina e a melanina.

Esses dados estão mais expressos nos grupos FTNP e HPS, este último onde os animais sofreram estresse cirúrgico e foram mantidos vivos 24 horas pós-procedimento. No entanto, o grupo HPS, que sofreu hepatectomia parcial, restando apenas o lobo lateral esquerdo, mostrou heterogeneidade nos gráficos apresentados, podendo ser decorrente à presença de vários cromóforos absorventes, como a hemoglobina, provenientes do processo de destruição dos eritrócitos. Também é relevante notar que, nos resultados do FTNP, a fluorescência em 0h para FTNP com ou sem *laser* foi muito baixa, o que pode ser resultado da influência do sangue local durante a cirurgia - já que o sangue é o principal absorvedor de ambos os comprimentos de onda de excitação. Após 24h, no entanto, é possível verificar claramente que a fluorescência está presente, mas notavelmente diferente para o grupo com *laser*. O grupo irradiado, quando não há sangue na amostra, apresenta um espectro tipicamente observado para o tecido hepático, enquanto para o grupo não irradiado, a forma do espectro é modificada do padrão regular para o tecido hepático, evidenciando a preservação das condições homeostáticas dos tecidos para o grupo que recebeu energia sob a forma de *laser* 660 nm.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a fotobiomodulação *laser* no nível celular, estimula o fotorreceptor citocromo-C-oxidase, resultando no aumento do metabolismo e produção de energia, consequentemente aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial e iniciando uma cascata de reações celulares que modulam o comportamento biológico e a angiogênese⁶¹. Ao realizarmos análise da fluorescência, durante todo o procedimento, é preciso inicialmente construir um quadro físico-químico do que está ocorrendo. Com este quadro em mente, torna-se possível vislumbrar o que a espectroscopia de fluorescência mostra a cada passo do processo.

Na Figura 16 podemos observar o comparativo das análises de espectroscopia e Ki67.

No grupo FTNP, a espectroscopia de fluorescência mostra que não houve diferença na atividade celular do subgrupo sem laser (SL) para o subgrupo com laser (L), uma vez que não foi aplicada injúria ao tecido hepático. Estes dados aparentemente se equiparam aos dados fornecidos pela análise imunohistoquímica de Ki67, com exceção da leitura verde, onde houve um incremento importante. Vale lembrar que o sangue é um grande absorvedor de luz verde e, portanto, a fluorescência do mesmo acaba por ser maior pela maior absorbância do comprimento de luz verde pelo sangue^{62,63}, fato que foi captado pelo espectrofotômetro. Esse dado corrobora com a literatura uma vez que o sangue é um grande absorvedor de luz verde (532 nm) e pode nos fornecer dados biológicos importantes^{62,63}. Também, as moléculas de NADH, FAD e as porfirinas emitem fluorescência nos comprimentos de 464 nm, 535 nm, e 630 – 690 nm, respectivamente, indo de encontro com os resultados encontrados em nossa análise espectral.

O grupo FTP, por sua vez, não sofre influência do sangue e nem do hospedeiro, portanto não recebe os estímulos hepatotróficos comumente advindos deles. O sangue foi totalmente substituído pela solução de preservação SPS-1, mas não recebeu injúria tecidual. Os dados espectrofotométricos mostram que os subgrupos FTP SL e L são muito semelhantes. A análise da fluorescência da luz violeta do subgrupo L foi maior por conta da ausência do sangue, o que favoreceu a captação e emissão da fluorescência violeta, captada então pelo espectrofotômetro. Ao que tudo indica, esses dados são comparáveis à análise de Ki67 neste grupo FTP, que de forma semelhante ao FTNP, mostra que não houve diferenças entre os subgrupos SL e L.

Na análise espectrofotométrica do grupo HPS houve um incremento substancial para o subgrupo L, em comparação com o subgrupo SL. Isto provavelmente ocorreu pelo fato de o tecido hepático ter sofrido injúria (hepatectomia 70%) associada ao fato de ter se mantido os fatores hepatotróficos necessários ao aumento da atividade celular. Observamos que mesmo não fornecendo energia na forma de luz *laser* houve um incremento importante na atividade celular, o que foi otimizado na medida em que se forneceu luz *laser* ao fígado remanescente. A análise de Ki67 corrobora para os dados do espectrofotômetro, apresentando diferença significativa entre esses subgrupos ($p=0,02$).

No grupo HPP, pela análise de espectrofotometria de fluorescência, houve diferença significativa ($p=0,002$) entre o subgrupo SL e o subgrupo L. A análise imunohistoquímica de Ki67 corresponde aos achados da espectroscopia de fluorescência. Ao que tudo indica, ocorreu uma queda de atividade celular do subgrupo L em comparação ao subgrupo SL, o que sugere que, apesar de ser um grupo onde a injúria hepática está presente, trata-se de um grupo onde os exemplares de fígado estavam livres dos fatores hepatotróficos, e por mais que receba um excedente de energia sob a forma de luz *laser*, o tecido hepático só aumentará sua atividade celular se houver necessidade metabólica para tal, impingido pelo sangue e pela pressão portal do hospedeiro. Apesar deste grupo mostrar que houve uma diminuição da regeneração hepática no subgrupo com *laser*, ressalta-se que ainda havia viabilidade celular e até mesmo alguma regeneração hepática, mesmo diante das condições desfavoráveis. A literatura mostra os efeitos do uso de *laser* 660 nm para estímulo de fotobiomodulação, e os resultados condizem com isso. Importante lembrar que pelo fato destes fígados analisados estarem totalmente livres de sangue e perfundidos com solução de preservação SPS-1, a leitura de fluorescência no comprimento de onda violeta foi maior. E, de acordo com Vollet-Filho, a análise de fluorescência mostrou padrões de variação que dizem respeito às mudanças bioquímicas do tecido, corroborando resultados anteriores da literatura e validando esses achados⁶³.

6. Conclusão

De uma forma geral e pelo exposto, quando comparamos a análise espectrofotométrica com a análise do Ki67, deduz-se que a espectroscopia de fluorescência pode ter a capacidade de identificar a viabilidade tecidual, uma vez que podemos observar o mesmo padrão de resultado do grupo HPS em ambas as técnicas, fato que corrobora com a literatura.

Tanto os dados dos espectros de fluorescência quanto a análise de Ki67 mostraram o mesmo padrão de resultado, sendo o aumento da atividade proliferativa diretamente associada à aplicação de luz *laser* 660 nm, de maneira que podemos dizer que mantivemos um padrão consistente quando comparado ao padrão ouro de análise, a imunohistoquímica de Ki67. Os dados apresentados até o momento são promissores, uma vez que a espectrometria de fluorescência, aparentemente pode ser utilizada para a análise de características da atividade e viabilidade celular em tempo real. Como segundo aspecto, também podemos inferir uma presença de atividade metabólica, tanto nos grupos de animais mantidos vivos, quanto nas amostras preservadas hipotermicamente, deduzindo que mesmo com a privação de sangue, sem informações do fluxo portal, e em condições de hipotermia após 24 horas, existe alguma atividade celular, e até mesmo alguma atividade regenerativa, ainda que reduzida. Quando mantivemos fatores hepatotróficos associados à aplicação de injúria tecidual, o fornecimento de energia na forma de luz *laser* (660 nm) ao tecido hepático aumentou a atividade metabólica e, portanto, o processo regenerativo. Em condições de hipotermia a 4°C, e na falta de um deles, seja de fatores hepatotróficos, seja de injúria tecidual, as análises realizadas mostram que o fornecimento de energia ao tecido hepático não incrementa a atividade metabólica do mesmo.

7. Anexos

7.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 21/08/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 107/14 intitulado: “Efeito do laser vermelho e do infravermelho na regeneração hepática e na expressão de micro-rnas de fígados remanescentes, após hepatectomia parcial a 70%, preservados hipotermicamente” que utilizará 112 animais da espécie **rato**, apresentado pelo Departamento de Gastroenterologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Orlando de Castro e Silva Junior

CEUA-FMUSP, 21 de Agosto de 2014



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

8. Referências

01. Michalopoulos G. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* 1990; 4:176-87.
02. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2000; 32:19-31.
03. Mortensen KE, Revhaug A. Liver regeneration in surgical animal models - A historical perspective and clinical implications. *Eur Surg Res.* 2011; 46:1-18.
04. Miyaoka Y, Miyajima A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div.* 2013; 8:1-12.
05. Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, García Sabrido JL. "Small-for-flow" syndrome: shifting the "size" paradigm. *Med Hypotheses.* 2013; 80:573-7.
06. Leng J, Xing H, Tan J, Chen K, Dong J. The safe minimally ischemic liver remnant for small-for-size syndrome in porcine hepatectomy. *Transplant Proc.* 2013; 45:2419-24.
07. Mori S, Kim H, Park MS, Choi Y, Hong G, Yi NJ et al. Graft Regeneration Rate and Small-for-Size Syndrome in Living Donor Liver Transplantation. *Hepatogast.* 2013; 60 (126): 1463-1468.
08. Cui YY, Qian JM, Yao AH, Ma ZY, Qian XF, Zha XM et al. SOD mimetic improves the function, growth, and survival of small-size liver grafts after transplantation in rats. *Transplantation* 2012; 94(7):687-694.
09. Sánchez-Cabús S, Fondevila C, Calatayud D, Ferrer J, Taurá P, Fuster J et al. Importance of the temporary portocaval shunt during adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2013;19(2):174-183.
10. Yuan Q, Loya K, Rani B, Mobus S, Balakrishnan A, Lamle J et al. MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2013; 57(1):299-310.
11. Chen H, Sun Y, Dong R, Yang S, Pan C, Xiang D et al. Mir-34a is upregulated during liver regeneration in rats and is associated with the suppression of hepatocyte proliferation. *Plos One.* 2011;6(5): e20238.
12. Fausto N, & Mead JE. Regulation of liver growth: protooncogenes and transformin growth factors. *Lab Invest.* 1989; 60(1):4-13.

13. Bailly-Maitre B, Bard-Chapeau E, Luciano F, Droin N, Bruey JM, Faustin B, Kress C, Zapata JM, Reed Jc. Mice lacking bi-1 gene show accelerated liver regeneration. *Cancer Res* 2007; 67:1442-1450.
14. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132:1133-49.
15. Factor VM, Seo D, Ishikawa T, Kaposi-Novak P, Marquardt JU, Andersen JB, et al. Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One* 2010;5(9): e12739.
16. Milloni W, Eberly JH. Some *laser* applications. In: *Laser* New York, Wiley interscience publ 1988;618-9.
17. Rudolph KL, Trautwein C, Kubicka S, Rakemman T, Bahr MJ, Sedlacek N et al. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*. 1999;30(5):1159-65.
18. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of *laser* application. *Laser Surg Med*. 1985; 5(1):31-39.
19. Simunovic Z. *Lasers in Medicine and Dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low-energy level laser therapy*. Croatia, A.K.D., 2000.
20. McCaughan Junior JS. *Photodynamic therapy of malignancies: A clinical manual*. Columbus, RG. Landes Company, 1992.
21. Nikfarjam M, Christophi C. Interstitial *laser* thermotherapy for liver tumors. *Br J Surg* 2003; 90:1033-47.
22. Bagnato VS, Kurachi C, Castro e Silva Od. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. *Acta Cir Bras* 2010; 25:214-6.
23. Ferraz RC, Ferreira J, Menezes PF, Sibata CH, Castro e Silva O Jr, Bagnato VS. Determination of threshold dose of photodynamic therapy to measure superficial necrosis. *Photomed Laser Surg* 2009; 27:93-9.
24. 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; 29:331-6.

25. 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; 40:722-5.

26. Castro e Silva T, Castro e Silva O, Kurachi C, Ferreira J, Zucoloto S, Bagnato VS. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:1065-9.

27. Oliveira AF, Silva TC, Sankarankutty AK, Pacheco EG, Ferreira J, Bagnato VS, Zucoloto S, Silva OdeC. The effect of *laser* on remanent liver tissue after 90% hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras* 2006; 21:29-32.

28. 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, *Acta Cir Bras* 2006;21:3-11.

29. Melo GB, Silva RL, Melo VA, Lima So, Antonioli AR, Castro e Silva T, Marcassa LG, Bagnato VS, Zucoloto S, Ramalho LN, Ramalho FS, Castro e Silva O Jr. Enhancement of liver regeneration by the association of *Hyptis pectinata* with *laser* therapy. *Dig Dis Sci* 2005; 50:949-54.

30. Melo CA, Kurachi C, Grecco C, Sibata CH, Castro e Silva O, Bagnato VS. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. *J Photochem Photobiol B* 2004; 73:183-8.

31. Melo CA, Lima AL, Brasil IR, Castro e Silva O Jr, Magalhães DV, Marcassa LG, Bagnato VS. Characterization of light penetration in rat tissues. *J Clin Laser Med Surg* 2001; 19:175-9.

32. Castro e Silva JRO, Ceneviva R, Franco CFF, Piccinato MANC, Roselino JES, Souza MEJ, Potenciano O, Zucoloto S. Impaired liver regeneration in extrahepatic cholestatic rats. *Res Surg* 1992; 4:32-4.

33. Castro e Silva JRO, Prozillo LC, Potenciano O, Muccillo G, Zucoloto S. The effect of low-energy He-Ne *laser* irradiation on liver regeneration. *Res Surg* 1991; 3:192-4.

34. Zucoloto S, Silva JC, Castro e Silva JRO, Gonzaga EZS, Fabbro ALD. Hepatic regeneration after hepatectomy in schistosomatic fibrosis. *Int J Exp Path* 1990; 71:465-8.
35. Zucoloto S, Silva JC, Figueiredo F. Fatores envolvidos na regeneração hepática na fibrose esquistossomótica. *Medicina* 1991; 24:105-10.
36. Lima AALA. Efeito da irradiação *laser* sobre o fígado de ratos cirróticos submetidos à hepatectomia parcial. Ribeirão Preto, 2001, pag.73. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
37. Castro e Silva Júnior O, Zucoloto S, Bagnato VS, Marcassa LG, Menegazzo LAG, Granato RG. *Laser* enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Laser Surg Med* 2001; 29:73-7.
38. Castro e Silva O Jr, Zucoloto S, Marcassa LG, Marcassa J, Kurachi C, Melo CA, Ramalho FS, Ramalho LN, Bagnato VS. Spectral response for enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. *Laser Surg Med* 2003; 32:50-3.
39. Godoy YPA, Gerson S, Pinto MS, Boff MF, Mascarenhas MÁ, Cardoso VV. Functional and cellular evaluation of the liver after low-power *laser* stimulation during surgery. *Arq Bras Cir Dig*. 2017; 30(2):122–126.
40. Croce AC, Ferrigno A, Vairetti M, Bertone R, Freitas I, Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy of rat liver during experimental transplantation procedure. An approach for hepatic metabolism assessment. *Photochem Photobiol Sci*. 2005; 4 (8):583-590.
41. Sankarankutty AK, Castro e Silva O, Ferreira J, Souza MEJ, Gomes MC, Kurachi C et al. Use of *laser* auto-fluorescence for evaluating liver grafts. *Las Phys Lett*. 2006; 3 (11):539-545.
42. Paddenberg R, Howold N, Hoger C, Janssen H, Grau V, Kummer W. Organ preservation solutions attenuate accumulation and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the hepatoma cell line HepG2. *Cell Biochem Funct*. 2009; 27(8):516-525.
43. Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo Letters*. 2013; 34(4):432-452.

44. Lu YC, Untaroiu CD. Effect of storage methods on indentation-based material properties of abdominal organs. *Proc Inst Mech Eng H*. 2013; 227(3):293-301.
45. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in livers allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 1992; 53(5):957-978.
46. Filho OG, Toderke EL, Baretta GAP, Sakamoto DG, Agulham MA, Tambara EM et al. Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos. *Arq Bras Cir Dig*. 2010; 23 (2): 74-80.
47. Correa RB. Aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência induzida por *laser* na avaliação de enxertos hepáticos humanos. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Medicina] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; 2010.
48. Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*. *Science*. 1962;137(3529):499–508.
49. Surre J, Saint-Ruf, C, Collin V, Orenca S, Ramjeet M, Matic E. Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival. *Sci Rep*. 2018; 12088.
50. Kelley K, Maxwell SE. Sample Size for Multiple Regression: Obtaining Regression Coefficients That Are Accurate, Not Simply Significant. *Psychological Methods*. 2003; 8(3):305-321.
51. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: I Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931; 12:186-202.
52. Skala MC, Ricking KM, Fitzpatrick AG, Eickhoff J, Eliceiri KW, White JG et al. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc Nat Acad of Sciences*. 2007; 104 (49): 19494-19499.
53. Harshad DV, Ahmed AH, Karl AK, Watt WW. Conformational Dependence of Intracellular NADH on Metabolic State Revealed by Associated Fluorescence Anisotropy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280 (26): 25119-25126.
54. Pires L, Nogueira MS, Pratavieira S, Moriyama LT, Kurachi C. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection. *Biomed Opt Express*.

2014;5(9):3080–3089.

55. Bottiroli G, Croce AC. Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3 (11-12): 189-210.

56. Santos TKGL, Carvalho LGA, Leitão ASL, Vanderlei ACQV, Carvalho AKFA, Vieira APSB. Uso de laserterapia de baixa potência no tratamento de lesões orais. *Ver Campo do Saber.* 2018; 4 (5): 240-257.

57. Chance BNS, Warren W, Yurtsever G. Mitochondrial NADH as the bellwether of tissue O₂ delivery. *Adv Exp Med Biol.* 2005; 566: 231-242.

58. Tominaga T. Estudos Espectroscópicos da Porfirina Aniônica Hidrossolúvel Meso-tetrakis (P-fenilsulfonato) em Meio Micelar. *Rev Cien Exatas e Nat.* 2007; 9(1): 9-21.

59. Von-dinh, T, Panjehpour M, Overholt BF. *Laser-induced fluorescence for esophageal cancer and dysplasia diagnosis.* *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 838:116-22.

60. Cavalcanti TM, Almeida-Barros RQ, Catão MHCV, Feitosa APA, Lins RDAU. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do *laser* com os tecidos biológicos na odontologia. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(5).

61. Henriques ACG, Cazal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. *Rev Col Bras de Cirurgias.* 2010; 37 (4):295-302.

62. Zahra JMA. Al-Timimi; Impact of *laser* (Nd: YVO₄ Crystals,532nm) radiation on white blood cells. *Iraqi Laser Scientists Journal.* 2019; 1 (3): 1 - 6.

63. Vollet-Filho JD, Ferreira-Strixino J, Correa RB, Bagnato VS, Silva Júnior OCE, Kurachi C. Fluorescence spectroscopy for clinical transplantation liver grafts monitoring: possibilities offered by 408 nm excitation. *Acta Cir Bras.* 2022; 12;37(9):e370905. doi: 10.1590/acb370905.

64. Pinheiro ALB, Brugnera Jr A, Zanin FAA. Aplicação do laser na odontologia. In: Pinheiro ALB. *Interação tecidual.* São Paulo: Editora Santos; 2010. p.77-89.

65. Moriyama LT. Ablação de resinas compostas com laser de Er: YAG sob diferentes fluxos de água. São Paulo (SP). Dissertação [Mestrado em Física Aplicada] - Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo; 2006.

66. Catão MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral.* 2004;3:214-8.

67. Chavantes MC, Tomimura S. Fundamentos do laser. In: Chavantes MC, editora. Laser em bio-medicina: princípios e prática. São Paulo: Atheneu; 2009. 87p.
68. Yoshiyasu RYA. Um estudo in vitro sobre os efeitos da irradiação pelo laser de Er: YAG combinado com a terapia com flúor na resistência ácida do esmalte de dentes submetidos a aparelho ortodôntico fixo. São Paulo (SP). Dissertação [Mestrado em Lasers em Odontologia] - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2001.
69. Karu TI. Low-Power Laser Therapy. In: Vo-Dinh, editor. Biomedic Photonic Handbook. Boca Raton (FL): CRC Press; 2003. p.1-26.
70. Henriques ACG, Maia AMA, Cimões R, Castro JFL. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. Odontologia Clín Científ. 2008;7:197-200.

9. Apêndice

9.1. Artigo Original publicado em periódico

Tsuge AT, Pereira J de J, Vollet Filho JD, Kubrusly MS, Galvão FHF, Ribeiro ON, Moreno CR, Ikegami RN, Chaib E, Castro e Silva Júnior O de. Study of laser fluorescence spectroscopy in livers of rats with hypothermic ischemia. Acta Cirurgica Brasileira. 2023; 38 e386023-1-e386023-12.

<https://doi.org/10.1590/acb386023>



ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

Original Article

<https://doi.org/10.1590/acb386023>

Study of laser fluorescence spectroscopy in livers of rats with hypothermic ischemia

Allison Takeo Tsuge^{1*}, Jaqueline de Jesus Pereira², José Dirceu Vollet-Filho³, Márcia Saldanha Kubrusly⁴, Flávio Henrique Ferreira Galvão⁵, Orlando Nascimento Ribeiro², Camila Rodrigues Moreno², Renata Nishiyama Ikegami², Eleazar Chaib⁵, Orlando de Castro e Silva¹

1. Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Cirurgia e Anatomia – São Paulo (São Paulo), Brazil.
2. Universidade de São Paulo – Hospital das Clínicas – Instituto do Coração – São Paulo (SP), Brazil.
3. Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos – São Carlos (SP), Brazil.
4. Universidade de São Paulo – Hospital das Clínicas – Departamento de Gastroenterologia – São Paulo (SP), Brazil.
5. Universidade de São Paulo – Hospital das Clínicas – Laboratório de Transplante e Cirurgia de Fígado – São Paulo (SP), Brazil.

ABSTRACT

Purpose: After partial hepatectomy (PH), the remaining liver (RL) undergoes regenerative response proportional to the host. Limited literature exists on hepatic viability after tissue injury during hypothermic preservation. Spectroscopy measures cellular fluorescence and is explored for tissue characterization and parameter investigation. This study aimed to assess fluorescence analysis (spectroscopy) in evaluating liver viability and its relationship with hepatic tissue regeneration 24 hours after PH. Additionally, we analyzed liver regeneration in RL after 70% partial hepatectomy under hypothermic conditions with laser irradiation. **Methods:** Fifty-six Wistar rats were divided into four groups: total non-perfused liver (control), total perfused liver, partial hepatectomy "in situ", and partial hepatectomy "ex situ". Tissue analysis was performed at 0 and 24 hours using spectroscopy with laser devices emitting at 532 (green) and 405 nm (violet). **Results:** Spectroscopy identified tissue viability based on consistent results with Ki67 staining. The fluorescence spectra and Ki67 analysis displayed similar patterns, linking proliferative activity and absorption intensity. **Conclusion:** Fluorescence spectroscopy proves to be promising for real-time analysis of cellular activity and viability. Metabolic activity was observed in groups of live animals and hypothermically preserved samples, indicating cellular function even under blood deprivation and hypothermic conditions.

Key words: Liver. Spectrum Analysis. Fluorescence. Ischemia. Lasers. Hepatectomy.

Introduction

The liver performs an important role because of its crucial metabolic functions such as protein synthesis and biotransformation of xenobiotics, besides the extraordinary regenerative capacity¹. Hepatic regeneration (HR) represents a natural protection mechanism against loss of functional tissue and occurs mainly because of the restoration of liver mass through hyperplastic or hypertrophic compensation in the remaining lobes, with a consequent increase in size, and a growth controlled by functional or anatomical factors^{2,3}.

*Corresponding author: allison.tsuge@gmail.com

Received: Jun 26, 2023 | Accepted: Sep 9, 2023

Research performed at Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brazil. Part of Allison Takeo Tsuge's PhD degree thesis, Postgraduate Program in Medicine (Surgical Clinic). Tutor: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior.



Acta Cir Bras. V38 . e386023 . 2023

