

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

**A RELAÇÃO ENTRE O DANO DE  
ISQUEMIA/REPERFUSÃO E O ESTÍMULO À  
FIBROGÊNESE EM MODELO EXPERIMENTAL EM  
FÍGADO DE RATOS: COMPARANDO DIFERENTES  
SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO.**

**Tese de Doutorado**

Vera Regina Rodrigues Camacho

Porto Alegre

Março de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

**A RELAÇÃO ENTRE O DANO DE  
ISQUEMIA/REPERFUSÃO E O ESTÍMULO À  
FIBROGÊNESE EM MODELO EXPERIMENTAL EM  
FÍGADO DE RATOS: COMPARANDO DIFERENTES  
SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO.**

**Tese de Doutorado**

Vera Regina Rodrigues Camacho

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora pelo Programa  
de Pós- Graduação: Ciências em Gastroenterologia  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr Mário Reis Álvares-da-Silva

Camacho, Vera Regina Rodrigues

A relação entre o dano de isquemia/reperfusão e o estímulo à fibrogênese em modelo experimental em fígado de ratos: comparando diferentes soluções de preservação/Vera Regina Rodrigues Camacho. .  
Porto Alegre: UFRGS, PPG: Ciências em Gastroenterologia, 2010

vii, 56f. : il.; 29 cm.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva

Tese (doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação: Ciências em  
Gastroenterologia, 2010

Referências Bibliográficas: f. 46 . 56

Onde você vê um obstáculo,  
alguém vê o término da viagem  
e o outro vê uma chance de crescer.  
Onde você vê um motivo para se irritar,  
alguém vê a tragédia total  
e o outro vê uma prova para sua paciência.  
Onde você vê a morte,  
alguém vê o fim  
e o outro vê o começo de uma nova etapa...  
Onde você vê a fortuna  
Alguém vê a riqueza material  
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.  
Onde você vê a teimosia,  
alguém vê a ignorância  
um outro compreende as limitações do companheiro,  
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.  
E que é inútil querer apressar o passo do outro,  
a não ser que ele deseje isso.  
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.  
Porque eu sou do tamanho do que vejo  
e não do tamanho da minha altura.

Pablo Neruda

## **DEDICATÓRIA**

Às minhas duas jóias preciosas **Luiza e Rafaela** que são a luz da minha vida, sempre compreendendo os atrasos e a falta de tempo para almoçar em casa, buscar na escola, ir ao cinema, enfim, tudo em prol da tese. Minhas meninas vivenciaram este período comigo vibrando com cada conquista, e esperando ansiosamente o dia da defesa. A espera para que elas crescessem e eu pudesse me dedicar a este estudo valeu a pena. Quero que saibam que sou muito grata e que esta jornada foi muito feliz por causa de vocês.

Ao meu amado marido **Luiz Henrique**, sempre ao meu lado apoiando e dando o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar a este estudo. Dois seres que se amam, juntos, no enriquecimento pessoal e na construção do saber.

Aos meus pais, **Lourdes e Arlindo Rodrigues**, sem o apoio dos quais, eu nunca teria chegado até aqui. Sempre me incentivando a estudar desde pequena e principalmente com seu exemplo de luta, honestidade e respeito ao próximo.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva**, agradeço pelo incentivo em iniciar o doutorado e o auxílio prestado em todas as fases desta jornada. Incansável e extremamente eficiente, sempre ao lado do seu doutorando. Tenho imensa admiração por sua competência e capacidade didática.

À **Dra Raquel Scherer de Fraga**, minha colega, amiga e companheira de todas as horas durante estes quatro anos. Agradeço pelo privilégio de tê-la conhecido e ter trabalhado ao seu lado, sendo contagiada pelo seu otimismo e grande capacidade de superação frente às dificuldades que não foram poucas.

**Mário e Raquel**, muito obrigada por tudo que me propiciaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, representado pelo **Dr. Sérgio Gabriel da Silva Barros**, pelo constante aprendizado, incentivo e apoio.

A **Prof. Dra Themis Reverbel da Silveira** por ter tido o privilégio de ser sua orientanda no Mestrado, pelo seu caráter e sua competência. Uma pesquisadora incansável, com energia contagiante. Um exemplo para todos nós.

Aos **Gestores do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Mãe de Deus, Dr. Bruno Galperim e Dr. Eduardo Corrêa** pela amizade, apoio e compreensão.

Ao **Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski**, pela análise histopatológica, sempre disponível e pronto a ajudar..

À **Prof. Dra Luise Meurer** pelo auxílio nas análises histopatológicas.

Ao **Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira**, por suas expressivas contribuições e por ter cedido sua equipe e laboratório para a realização desta tese.

Ao **Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira**, pelo fornecimento da SNAC e pelo incentivo e apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

A **Gabriela Freitas P. de Souza**, doutoranda em química pela UNICAMP, pelo interesse e supervisão constante.

À **Vania Naomi Hirakatu**, pelo grande auxílio na análise estatística, pela paciência e por estar sempre disponível para me auxiliar

A **Prof. Carmen Pilla**, pela realização das análises bioquímicas.

À **Prof. Norma Anair Possa Marroni**, pelo empréstimo da mesa cirúrgica, indispensável à realização dos procedimentos cirúrgicos.

À Equipe da **Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pela competência e ajuda contínua durante os procedimentos experimentais.

À amiga **Marybel Rodrigues Rivero** pela tradução e formatação e principalmente pelo apoio e amizade.

Às minhas queridas secretárias **Luciana Fonseca, Mari Fortunato e Fátima Lucas**, por toda compreensão, carinho e auxílio na resolução dos contratempos que tivemos ao longo desta jornada.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, **Moema Vianna Goulart e Jamile da Silva Ladeira, Fernando Augusto Soares**, secretário do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo carinho, competência e todo auxílio dispensados

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica da ULBRA**, pela realização da microscopia eletrônica.

Ao **Sr. Jorge Alberto Lopes**, pela confecção das lâminas para análise histopatológica.

Ao acadêmico de Medicina, **Erik da Costa Irion**, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e coleta de material.

Aos meus **pacientes** que gentilmente compreenderam os cancelamentos, transferências de consultas e que sempre incentivaram o meu crescimento.

Aos meus **amigos e familiares** que tanto ouviram falar na tese e que sempre me estimularam a seguir em frente.

À **CAPES** pela concessão de bolsa de doutorado.

Ao **FIPE-HCPA** pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta tese e que, involuntariamente, deixaram de ser nominadas.



**SUMÁRIO****LISTA DE ABREVIATURAS *i*****LISTA DE TABELAS *iii*****LISTA DE FIGURAS *iv*****RESUMO *v*****ABSTRACT *vi*****INTRODUÇÃO 1**

1. Transplante hepático 1
2. Dano de isquemia-reperfusão 3
3. Estresse oxidativo 6
4. Soluções de preservação 8
5. Estímulo a fibrogênese 11

**JUSTIFICATIVA 15****OBJETIVOS 16****MATERIAIS E MÉTODOS 17**

1. Desenho do estudo e animais de experimentação 17
2. Procedimentos 17
3. Mensuração de TBARS, catalase e glutatona no tecido hepático 19
4. Análise histopatológica 19
5. Imuno-histoquímica 20
6. Microscopia eletrônica 20
7. Tamanho da amostra 21
8. Análise estatística 21

**ASPECTOS ÉTICOS 22****FINANCIAMENTO 23****RESULTADOS 24**

1. Preservação a frio 24

2. Reperusão 27
3. Histologia 28
4. Imuno-histoquímica 30
5. Microscopia eletrônica 32

## **DISCUSSÃO 32**

1. Em relação à linha de pesquisa em isquemia/reperusão hepática 32
2. Em relação ao desenho do estudo 35
3. Em relação aos resultados durante isquemia a frio 37
4. Em relação aos resultados após a reperusão 39
5. Limitações do estudo 43
6. Possíveis aplicações futuras 43

## **CONCLUSÕES 45**

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46**

## **ANEXOS**

1. Dados brutos
2. Descrição das variáveis utilizadas
3. Artigo para publicação

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABTO= Associação Brasileira de Transplante de Órgãos**

**ACE= enzima conversora do angiotensinogênio**

**ALT= alanina aminotransferase**

**ANG- I = angiotensina I**

**ANG- II= angiotensina II**

**ANOVA= análise de variância**

**ANTI-HBc= anticorpo contra a proteína do core do vírus B**

**AST=aspartato aminotransferase**

**CES= células endoteliais sinusoidas**

**CK= células de Kupffer**

**CREAL=Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório**

**eNOS=óxido nítrico sintase endotelial**

**EO= estresse oxidativo**

**FAP =fator ativador de plaquetas**

**FBP= fructose -1,6- bisfosfato**

**GM= granulócitos-macrófagos**

**HCPA= Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

**HE= hematoxilina-eosina**

**HCV RNA PCR= reação em cadeia da polimerase do RNA do vírus C**

**HTK= histidina-triptofano-cetoglutarato**

**IFN- = interferon**

**IL-1= interleucina 1**

**IL-6 = interleucina 6**

**i NOS = óxido nítrico sintase induzível**

**I/R= Isquemia/reperfusão**

**LDH= lactato desidrogenase**

**LT B4= leucotrieno B4**

**MIP-2= proteína inflamatória dos macrófagos**

**n NOS= óxido nítrico sintase neuronal**

**NO= óxido nítrico**

**RL = radicais livres**

**ROS= espécies reativas do oxigênio**

**RSNO =S-nitrosotiol**

**SF= soro fisiológico**

**SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína**

**TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

**TGF  $\beta$  1= fator de crescimento  $\beta$  1**

**TNF-  $\alpha$  = fator de necrose tumoral  $\alpha$**

**TxH= transplante hepático**

**UEA= Unidade de Experimentação Animal**

**UW= solução de preservação da Universidade de Wisconsin**

**HBV= vírus da hepatite B**

**HCV= vírus da hepatite C**

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Características do procedimento: peso do doador, tempo de isquemia a quente e tempo de reperfusão 24

**Tabela 2.** Dosagem de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase no líquido de preservação nos cinco grupos experimentais 25

**Tabela 3.** Dosagem de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, catalase, glutatona e renina após a reperfusão nos cinco grupos experimentais 27

**Tabela 4.** Estudos experimentais com diferentes soluções de preservação em comparação com a solução da Universidade de Wisconsin 34

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Mecanismos envolvidos na fisiopatogênese do dano de I/R 5
- Figura 2.** Ilustração da ativação da célula estrelada 12
- Figura 3.** Representação esquemática do sistema renina-angiotensina 14
- Figura 4.** Esquema simplificado do modelo de reperfusão 18
- Figura 5.** Níveis de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase no líquido de preservação 26
- Figura 6.** Achados anatomopatológicos das amostras estudadas - balonização hepatocitária focal 28
- Figura 7.** Achados anatomopatológicos das amostras estudadas - congestão hepática leve focal 29
- Figura 8.** Achados anatomopatológicos das amostras estudadas - necrose focal 29
- Figura 9.** Achados anatomopatológicos das amostras estudadas . esteatose 30
- Figura 10.** Achados anatomopatológicos das amostras estudadas - imunohistoquímica da expressão de TGF- 1 31

## **RESUMO**

**Introdução e objetivos:** O transplante de fígado é o tratamento de escolha para muitas doenças agudas e crônicas do fígado. Embora a sobrevida tenha melhorado consideravelmente, a recidiva é frequente, especialmente na hepatite C. O dano de isquemia-reperfusão (I/R) é uma das principais causas de má-função do enxerto precocemente após um transplante hepático e influencia de forma adversa a sobrevida dos pacientes. Assim, utilizando-se a solução de preservação que propicie maior proteção ao dano de I/R e menos estresse oxidativo, deveremos ter menor produção de citocinas que desencadeiam o processo de fibrogênese, o qual sabemos estar presente na recidiva do vírus C. O emprego de uma solução de preservação que leve a menor dano de I/R deve influenciar no processo de fibrogênese, o que justifica seu estudo.

**Materiais e métodos:** Fígados obtidos de 25 ratos *Wistar* machos foram divididos em 5 grupos experimentais, conforme a solução de preservação utilizada: solução fisiológica; solução da Universidade de Wisconsin (UW); fructose 1,6- bisfosfato (FBP); solução de SNAC 200 e solução de UW + SNAC (SNAC+UW). Os níveis de AST, ALT e LDH foram determinados em amostras do líquido de preservação em 2, 4 e 6 horas de isquemia a frio. Após 6 h, os fígados foram submetidos ao modelo de reperfusão hepática *ex-situ* por 15 minutos. AST, ALT, LDH e renina foram determinadas no sangue após a reperfusão. Foram seccionados fragmentos hepáticos para histologia, determinação de TBARS, catalase e glutathione, além da análise da expressão imunohistoquímica de TGF- 1 e receptor AT1.

**Resultados:** Em comparação à UW, durante a preservação a frio, AST foi significativamente menor nos grupos SF, FBP e SNAC 200 ( $p=0,001$ ); ALT foi menor no grupo FBP ( $p= 0,023$ ) e LDH foi menor nos grupos FBP e SNAC 200 ( $p=(0,007)$ ). Após a reperfusão, os níveis séricos de AST, ALT, LDH e TBARS não diferiram entre os grupos. Os valores de catalase foram significativamente mais elevados com SNAC+UW ( $p= 0,013$ ). Os valores de glutathione foram significativamente mais elevados com UW em relação a SF, FBP e SNAC 200 ( $p= 0,004$ ). Os níveis de renina foram maiores para SNAC+UW comparando com FBP e SNAC ( $p=0,014$ ) Não houve sinais histológicos de dano de preservação em nenhuma amostra, assim como não houve expressão hepática de TGF- 1 e receptor AT1.

Conclusão: neste modelo experimental de dano de reperfusão precoce, o dano de preservação promoveu elevação na atividade da renina, o primeiro passo para a fibrogênese. SNAC 200, um doador de óxido nítrico e FBP demonstraram efeito protetor neste contexto, tendo sido superiores a UW.

## **ABSTRACT**

Background/aims: Liver transplantation has been the standard treatment for patients suffering from acute and chronic liver disease. Although survival rate has improved considerably, relapses are frequent especially in patients with hepatitis C. Ischemia-reperfusion injury (I/R) is the one of the major causes of poor graft function early after liver transplantation and adversely influences patients' survival. Therefore, using a preservation solution that shows a higher protective effect from I/R injury and lesser oxidative stress may lower the production of cytokines which are known for their role in fibrogenesis related to the relapse of C virus. Preservation solutions which lesser I/R injury and may prevent from fibrogenesis are an area of clinical interest that should be extensively studied.

Materials and methods: Livers from 25 adult male Wistar rats were randomly assigned into five experimental groups according to preservation solution used: saline solution (SS); University of Wisconsin (UW) solution; Fructose 1, 6-biphosphate (FBP), SNAC 200 solution and UW solution + SNAC (SNAC+UW). AST, ALT and LDH were determined in samples in preservation solutions at 2, 4 and 6 hours of cold ischemia. After 6 hours, livers were applied to hepatic reperfusion models *ex-situ* for 15 minutes. Then, blood samples were taken for screening AST, ALT, LDH and renin levels after the reperfusion. Hepatic fragments were processed for histological studies, determination of TBARS, catalase and glutathione and expression of TGF- $\beta$ 1 and AT1 receptor.

Results: Comparing to UW solution during cold storage, AST was significantly lower than in SS, FBP and SNAC 200 groups ( $p=0.001$ ); ALT was lower in FBP group ( $p=0.023$ ) and LDH was lower in FBP and SNAC 200 groups ( $p=0.007$ ). After reperfusion, serum levels of AST, ALT, LDH and TBARS showed no significant differences among the groups. Catalase was significantly higher in



the SNAC+UW group ( $p=0.013$ ). Compared to UW group, glutathione concentration was significantly higher in SS, FBP e SNAC 200 ( $p=0.004$ ). Renin levels were higher in SNAC+UW group comparing to FBP and SNAC groups ( $p=0.014$ ) No histological signs of preservation injury were found in the hepatic samples studied and expressions of TGF- 1and AT1 receptor were not detected either.

Conclusion: In this experimental model of early reperfusion injury, preservation damages showed higher levels of renin which is widely known as the first stage of fibrogenesis. SNAC 200, NO donor and FBP showed a higher protective effect than UW in our study.

## **INTRODUÇÃO**

O transplante hepático (TxH) tornou-se um procedimento frequente para pacientes com doença hepática terminal. Apesar dos progressos a sobrevida a curto e longo prazo, a disfunção primária do enxerto permanece um importante problema, estando associada com a maior duração da isquemia a frio e possivelmente como dano de isquemia/reperfusão (I/R) que desencadeia todo o processo de estresse oxidativo<sup>(1,2,3)</sup>.

O dano de I/R do fígado transplantado é fenômeno complexo e pouco compreendido. Envolve numerosas vias metabólicas e mecanismos fisiopatológicos ainda não esclarecidos com inúmeras possibilidades de estudos.

A evolução deste procedimento depende do progresso dos métodos de preservação, mais do que imunossupressão ou técnicas cirúrgicas, os quais tem apresentado expressiva evolução<sup>(4)</sup>. Portanto, a procura por soluções de preservação isoladas ou com associação de substâncias, deve ser mantida e estimulada, a fim de evitarmos ao máximo o dano de I/R.

### **1. Transplante hepático**

O TxH é um procedimento consagrado, tratamento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves do fígado<sup>(2,5,6)</sup>. Tem sido realizado cada vez mais precoce e não em fase final de doença hepática avançada quando o paciente se encontra em condições desesperadoras.

A sobrevida tem melhorado de forma considerável, através do avanço da imunossupressão pós-transplante e do tratamento e controle das doenças infecciosas<sup>(6)</sup>. Segundo dados da ABTO, após um ano de transplante,

a sobrevida passou de cerca de 30% nos anos 70 para 85-90% no final da década de 80. Em 1999, a sobrevida era de 87,5% após 1 ano de transplante e de 73,9% após 5 anos.

A despeito do aumento no número de TxH, a mortalidade de pacientes aguardando em lista permanece entre 5-10% com um longo período de espera<sup>(7)</sup>.

No Brasil, o TxH apresentou crescimento até 2006 e uma redução em 2007 (955 transplantes de fígado em 2004, 956 em 2005, 1025 em 2006 e 997 em 2007), refletindo o problema ocasionado pela escassez de doadores de órgãos (dados da ABTO).

As maiores causas de transplante de fígado no mundo são as infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) no oriente e vírus da hepatite C (HCV) no ocidente.

A doença hepática associada à infecção pelo HBV nas suas formas agudas e crônicas é causa atualmente de 5 a<sup>(8)</sup> 10 % dos TxH. O risco da re-infecção espontânea após o transplante é de 80% e pode ser causa de falência do enxerto, retransplante e óbito. A recorrência pós-transplante ocorre em mais de 20% dos casos, a despeito da terapêutica profilática instituída<sup>(6)</sup>.

A outra causa de TxH mais frequente é a doença hepática crônica causada pelo HCV, presente em 25% a 40% dos transplantados de fígado na Europa e Estados Unidos<sup>(6,9)</sup> e a causa mais frequente de TxH no Brasil (dados ABTO). Embora a persistência do HCV RNA no soro após o transplante hepático seja praticamente universal, a história natural do pós-transplante é variável, podendo ser leve após 1 a 2 anos ou ter um curso acelerado, evoluindo para cirrose em 5 anos<sup>(10,11,12)</sup>. Pode-se ter evolução para a forma mais temida de complicação, a hepatite fibrosante colestática, que tem sido observada na recidiva do HCV, embora seja mais comum na recidiva do HBV pós-transplante. Nela, ocorrem alterações degenerativas dos hepatócitos incluindo edema celular e citólise, levando à rápida progressão para falência hepática<sup>(11, 12,13)</sup>.

As razões para esta variabilidade na gravidade da expressão da doença decorrente da recidiva permanecem incertas, embora episódios de rejeição, *status* HLA doador- receptor, viremia pré-transplante e genótipo viral tenham sido propostos como variáveis contribuintes<sup>(6,10,12)</sup>.

Além da recidiva das doenças que mais comumente são as indicações para o TxH , podemos ter outros fatores para o comprometimento dos resultados, que é a utilização do doador marginal ou mais modernamente chamado doador com critérios expandidos a fim de aumentar o *pool* de doadores. Os doadores com critérios expandidos são aqueles que apresentam, entre outras características, idade acima de 70 anos, esteatose acentuada, parada cardíaca, HCV ou anti-HBc total reagente<sup>(7)</sup>.

Todos estes fatores podem contribuir para a disfunção primária do enxerto que representa importante causa de mortalidade e morbidade pós-operatória<sup>(2)</sup>, o que torna tão importante o estudo de toda as fases que envolvem o TxH a fim de melhorarmos cada vez mais seus resultados.

## **2. Dano de isquemia e reperfusão**

O dano de isquemia/reperfusão (I/R) é decorrente dos fenômenos nocivos secundários a isquemia tecidual que ocorre em maior ou menor grau em todos os transplantes de fígado<sup>(14,15,16,17)</sup>, e que são decorrentes das condições pré-mórbidas do doador, da isquemia a quente do órgão antes e durante sua retirada e da adequação da preservação, bem como daqueles provindos do estoque a frio<sup>(18,19)</sup>.

Baron et al em 2000, levantou a hipótese de que o dano de I/R pode predispor a gravidade das lesões causadas pelo HCV após o transplante<sup>(20)</sup> . No momento da restauração do fluxo sanguíneo, ocorre nova agressão ao fígado enxertado, agravando-se a lesão causada pelo período de isquemia,

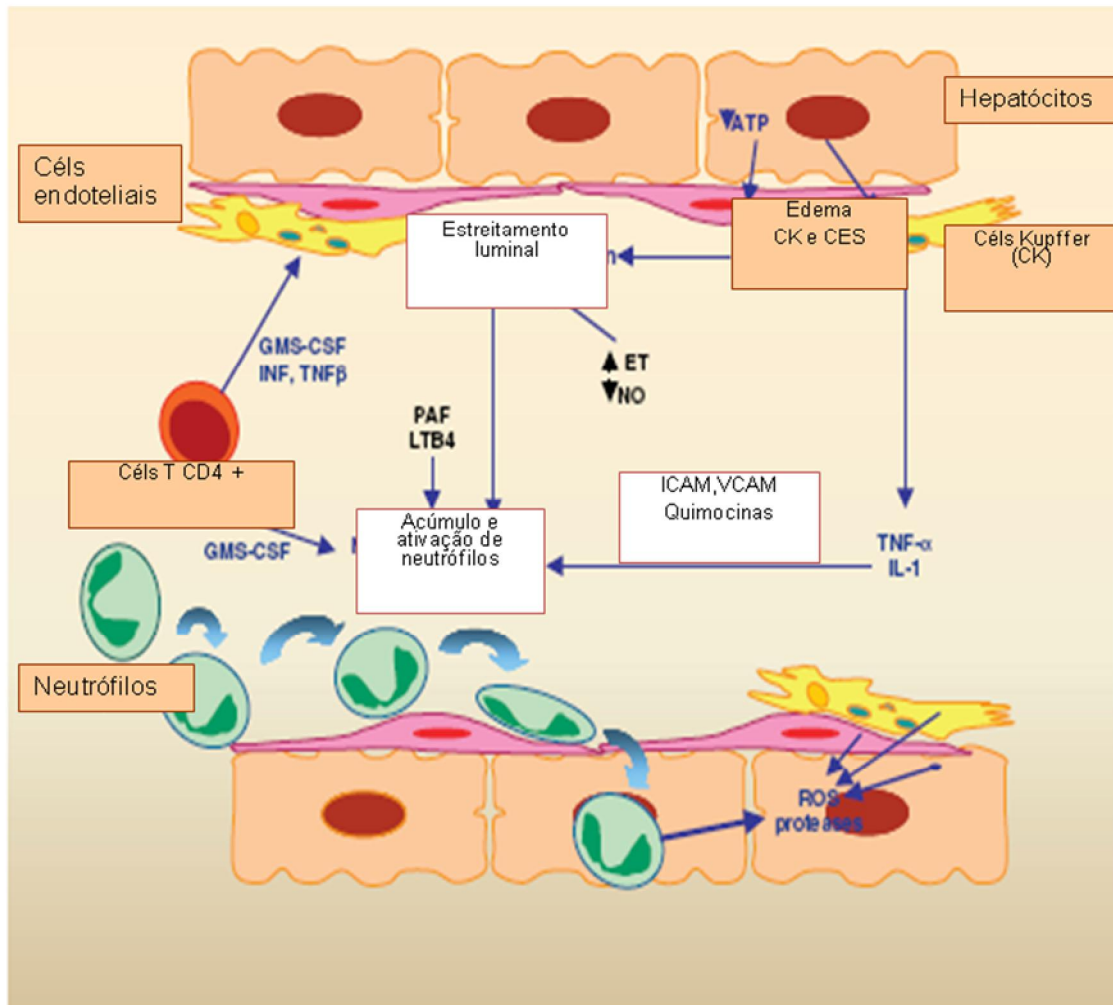
envolvendo mecanismos e vias metabólicas celulares complexas, cujo resultado final é a disfunção primária do enxerto<sup>(2)</sup>.

Vários fatores podem atuar em diversas fases acarretando dano ao enxerto. São potenciais causas a lesão de pré-preservação, a lesão de preservação a frio, a lesão de preservação a quente e a lesão de reperfusão<sup>(21)</sup>.

Quando há isquemia, por definição, há ausência de fluxo sanguíneo, caracterizando hipóxia tecidual. A hipóxia determina diminuição do aporte de oxigênio à célula, com redução dos fosfatos ricos em energia, redução da atividade da bomba Na/K e alteração na troca de água e íons. Ocorre então acúmulo intracelular de íons e conseqüente influxo de água, com edema celular, a que se seguem glicólise em anaerobiose e queda do pH, culminando em dano isquêmico<sup>(21, 22)</sup>.

Na fase inicial de dano (até 2h após reperfusão), ocorre edema das células de Kupffer (CK) que leva a um desequilíbrio entre a produção de óxido nítrico (NO) e produção de endotelinas, que contribui com a constrição do lumen sinusoidal e conseqüente disfunção microcirculatória. Estudos recentes demonstram que o NO pode exercer efeito protetor sobre o fígado, reduzindo a produção de endotelinas e disfunção microcirculatória<sup>(23, 24)</sup>. Os eventos que ocorrem nesta fase inicial desencadeiam uma cascata de fenômenos que culminam com migração de neutrófilos em fase mais tardia (6h a 24 h após a reperfusão)<sup>(2,16, 25)</sup>.

Nesta fase, as citocinas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL-6 e IL-1) recrutam e ativam CD4+ Linfócitos-T, os quais produzem granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferon (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\beta$ ), que são os responsáveis pela migração e adesão de neutrófilos aos sinusóides hepáticos<sup>(16, 25,26)</sup>. A interação entre neutrófilos e as células endoteliais sinusoidais (CES) é pré-requisito para a lesão da microvasculatura, ocorrendo a fixação e migração dos mesmos através do endotélio, causando destruição de tecidos pela liberação de radicais livres (RL), enzimas proteolíticas e peroxidase, mediados pelo fator ativador de plaquetas (FAP) e leucotrieno B4 (LT B4)<sup>(2,25)</sup>.



**Figura 1:** Mecanismos envolvidos na fisiopatogênese do dano de I/R. (Adaptado de Massip-Salsedo et al, 2007) <sup>(25)</sup> .

CES= células endoteliais sinusoidais; ET= endotelina; GM-CSF = fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; ICAM= moléculas de adesão intercelular; LTB4= leucotrieno B4; PAF=fator ativador de plaquetas; VCAM= moléculas de adesão de célula vascular

A determinação da atividade das enzimas hepáticas no líquido de preservação pode evidenciar a lesão celular sofrida no período de isquemia a frio e, com isto, determinar fator prognóstico para funcionamento do órgão e viabilidade do mesmo para transplante. A liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) na solução de preservação pode ser considerada um importante índice para avaliar a qualidade da preservação do órgão <sup>(27)</sup>, sendo

um marcador dos danos pré-existentes ou adquiridos durante o período de isquemia<sup>(28)</sup>.

Além disso, as lesões decorrentes do dano de preservação podem ser aferidas pela magnitude da elevação das enzimas hepáticas no soro do receptor, especialmente a AST. Rosen *et al* estudando 210 indivíduos submetidos a TxH, demonstraram que os pacientes com AST acima de 5000 UI/L nas primeiras 72 horas pós-transplante, têm significativamente menor sobrevida em 1 ano que os restantes<sup>(29)</sup>. Álvares-da-Silva, em sua tese de doutorado, analisando a influência do dano de preservação na evolução pós-operatória na primeira semana, encontrou resultados semelhantes. Igualmente, a sobrevida em 1 ano foi significativamente menor no grupo de pacientes com dano de preservação acentuado<sup>(30)</sup>.

### 3. Estresse oxidativo

Após este período de lesão celular inicial decorrente da hipóxia, ocorre a reintrodução do fluxo de oxigênio no momento da reperfusão, o que provoca o ~~paradoxo~~ paradoxo do oxigênio, com aumento da lesão celular através de lesão mitocondrial que promove excessiva geração de RL, aumento de citocinas e ativação de células inflamatórias, o chamado estresse oxidativo (EO)<sup>(31)</sup>. Denomina-se EO, o estado químico-biológico em que a produção de RL ultrapassa a capacidade antioxidante. RL é um termo utilizado para caracterizar átomos ou moléculas que contém elétron não pareado na última camada, sendo por isso substâncias reativas o suficiente para causar lesão em estruturas biológicas como a membrana celular<sup>(2,32,33)</sup>.

O radical hidroxila é o mais reativo dos RL do sistema biológico e é provavelmente o responsável pela maioria das lesões celulares. A geração de RL decorre da produção de superóxidos e peróxido de hidrogênio intramitocondriais que se difundem por toda a célula, gerando espécies oxidativas extremamente reativas<sup>(2,34)</sup>.

Os RL promovem a peroxidação dos lipídios existentes sob a forma de fosfolipídeos e ácidos graxos insaturados nas membranas celulares, e é desta forma que ocasionam a lesão celular<sup>(35, 36)</sup>. A peroxidação lipídica ocasiona alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, com conseqüente perda da seletividade na troca iônica, liberação de conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído, culminando em morte celular<sup>(37)</sup>.

A quantificação do EO é muito importante para inferir o grau de disfunção hepática no período pós-operatório, mas só pode ser feita de forma indireta, uma vez que os RL são efêmeros<sup>(38)</sup>. A mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), geradas através da lipoperoxidação pelos RL, vem sendo utilizada como estimativa do EO<sup>(39, 40)</sup>, assim como a quantificação de substâncias anti-oxidantes como a catalase, óxido nítrico e glutatona reduzida<sup>(41)</sup>.

A catalase é uma enzima intracelular, que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ( $H_2O_2 = H_2O + O_2$ ) e está amplamente distribuída no corpo humano, especialmente no fígado, rins e eritrócitos<sup>(42, 43)</sup>.

O óxido nítrico é uma molécula gasosa produzida por enzimas da família P-450 chamadas óxido nítrico sintases que convertem L-arginina e oxigênio em L-citrulina e óxido nítrico. Existem 3 isoformas: endotelial (eNOS), induzível (iNOS) e neuronal (nNOS). Todas elas estão expressas no fígado em proporções variadas<sup>(44)</sup>. Tanto a nNOS quanto a eNOS mantêm especificidade celular, sendo a primeira detectada apenas nos tecidos nervosos e a última, exclusivamente nas células endoteliais que revestem os canais vasculares hepáticos<sup>(45-46)</sup>. Em contrapartida, iNOS não está presente no fígado em condições basais, mas pode ser expressa em todos os tipos celulares hepáticos mediante estímulo<sup>(47-48)</sup>.

Há evidências de que o NO tenha papel protetor da microcirculação hepática durante o dano de I/R, atuando como seqüestrador de RL<sup>(2,23)</sup>. Em



baixas concentrações, ele exerce efeito citoprotetor e quando em níveis elevados, exerce efeito citotóxico<sup>(2,26)</sup>.

Estudos em modelos animais deficientes para o gene da eNOS ou iNOS sugerem que a geração sistêmica ou local de iNOS regulam a reperfusão hepática, e que a ação da iNOS local contribui para a lesão hepática, enquanto eNOS tem papel protetor na lesão de isquemia e reperfusão hepática<sup>(2)</sup>.

A glutathiona reduzida é um antioxidante hidrossolúvel reconhecido como o tiol não proteico mais importante dos seres vivos, sendo constituído por três aminoácidos : glicina, ácido glutâmico e cisteína. Está presente na maioria das células, mas sua maior concentração ocorre no fígado<sup>(49)</sup>. A glutathiona pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula<sup>(37,50)</sup>.

#### **4. Soluções de preservação**

A preservação de órgãos é elemento essencial para o sucesso de um transplante. A manutenção da viabilidade do órgão durante a preservação, é um pré-requisito muito importante para o sucesso do transplante, principalmente no momento atual, com o aumento da utilização dos doadores não ideais, ou seja, com critérios expandidos<sup>(51,52)</sup>.

A utilização de uma solução de preservação efetiva e segura é fundamental durante o período de preservação do órgão, a fim de tentar minimizar o dano causado pelo período de isquemia<sup>(53)</sup>. O princípio da hipotermia começou na década de 50 e desde então, a preservação a frio é a técnica rotineiramente empregada e tem sido considerada essencial na preservação do órgão<sup>(54,55)</sup>. A hipotermia reduz a taxa metabólica e assim, prolonga o tempo que as células anóxicas podem reter atividades metabólicas essenciais<sup>(56)</sup>.

Até 1987, quando a Solução da Universidade de Wisconsin (UW) foi introduzida, era possível preservar adequadamente os órgãos por um período de até 4 h. A partir daí, grandes modificações ocorreram nos procedimentos de transplante e UW é hoje considerada a solução de preservação padrão com efeito na prevenção da acidose intracelular, mantendo o metabolismo energético e protegendo contra ação das substâncias reativas ao oxigênio<sup>(57)</sup>. Estes efeitos benéficos devem-se principalmente a presença de lactibionato, rafinose, hidroxietilamida, insulina, glutatona e adenosina<sup>(58)</sup>.

A solução de UW protege o enxerto principalmente contra os danos decorrentes da fase isquêmica, sendo menos protetora na reoxigenação<sup>(58,59)</sup>. A sua principal ação é o que lhe faz superior em relação a outras soluções - parece ser a capacidade de proteção endotelial, que é o alvo inicial do dano de preservação<sup>(60,61)</sup>. A mensuração de atividades enzimáticas no efluente do órgão preservado no final da isquemia a frio, nos mostra a qualidade da preservação do órgão antes do transplante<sup>(27,28,62)</sup>.

A alta viscosidade da solução de UW pode causar perfusão sinusoidal insuficiente, induzindo distúrbio microcirculatório com possibilidade de influência negativa no resultado do transplante<sup>(63)</sup>. No entanto, a UW permanece a solução padrão mais utilizada.

A solução histidina-triptofano-ketoglutarato (HTK) foi inicialmente usada a partir da década de 70 em transplante cardíaco e posteriormente em transplante de rins, pâncreas e fígado. Possui viscosidade menor que a solução de UW e custo mais baixo. Estudos comparativos entre UW e HTK tem demonstrado resultados semelhantes entre elas, quando avaliada a incidência de disfunção primária do enxerto e sobrevida em 1 ano embora a elevação de AST e ALT seja maior no grupo que utilizou HTK, resultado este sem relevância clínica<sup>(63,64)</sup>.

A solução Celsior foi introduzida em 1994 e tem sido demonstrado efeito benéfico na preservação dos órgãos, observando-se resultados semelhantes comparando com UW<sup>(63,65,66)</sup>, sendo necessários ainda mais estudos.

A busca por um método de preservação que seja mais barato e tão eficaz quanto a UW, tem sido desejada. A fructose-1,6-bisfosfato (FBP), que é um intermediário altamente energético da glicólise, poderia ser uma alternativa à UW. A FBP parece reduzir a lesão tecidual associada à isquemia, choque e dano tóxico, por sua capacidade de aumentar a utilização anaeróbica de carboidratos e inibir a geração de RL pelos neutrófilos<sup>(63,66)</sup>. Além disso, estudos demonstram o efeito benéfico da FBP endógena na proteção do dano hepático por sua capacidade de estabilizar a permeabilidade da membrana celular ao fluxo de íons, mantendo o nível de cálcio e ATP intracelulares<sup>(62, 63,67,68)</sup>.

Sua utilização exógena pode ter efeitos benéficos ou deletérios, dependendo da dose utilizada. Em 2002, Nunes et al observou melhora de sobrevivência em modelo de sepsis em ratos, utilizando 500 mg/kg de FBP<sup>(69)</sup> e em estudo pelo mesmo autor em 2003 avaliando efeito letal cardíaco, demonstrou que doses até 750 mg/Kg eram bem toleradas<sup>(67)</sup>.

Em estudo realizado por Hirakawa et al em 2002, foi demonstrado que a FBP durante isquemia a frio, teve a capacidade de atuar sobre as CK reduzindo a produção de NO e citocinas inflamatórias, mais do que UW<sup>(4)</sup>. Fraga em sua tese de mestrado, também mostrou superioridade de FBP em relação a UW no período de isquemia frio, levando em consideração AST, ALT e LDH<sup>(70)</sup>.

A S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) é um S-nitrosotiol (RSNO) sintetizado, considerado doador e carreador endógeno de NO quando administrado em mamíferos<sup>(71)</sup>. Seu uso terapêutico ainda está sob experimentação e muitos estudos indicam que pode ser de especial interesse no tratamento de algumas doenças. Um estudo prévio demonstrou que o tratamento com SNAC, um potente inibidor da lipoperoxidação lipídica, impede o aumento de hidroxiperóxidos no homogenizado hepático<sup>(72)</sup>. Além disso, ao se analisar o perfil da expressão gênica hepática em camundongos com esteato-hepatite não-alcóolica, foi demonstrada uma expressão reduzida dos genes que participam da cadeia respiratória e dos genes responsáveis pela

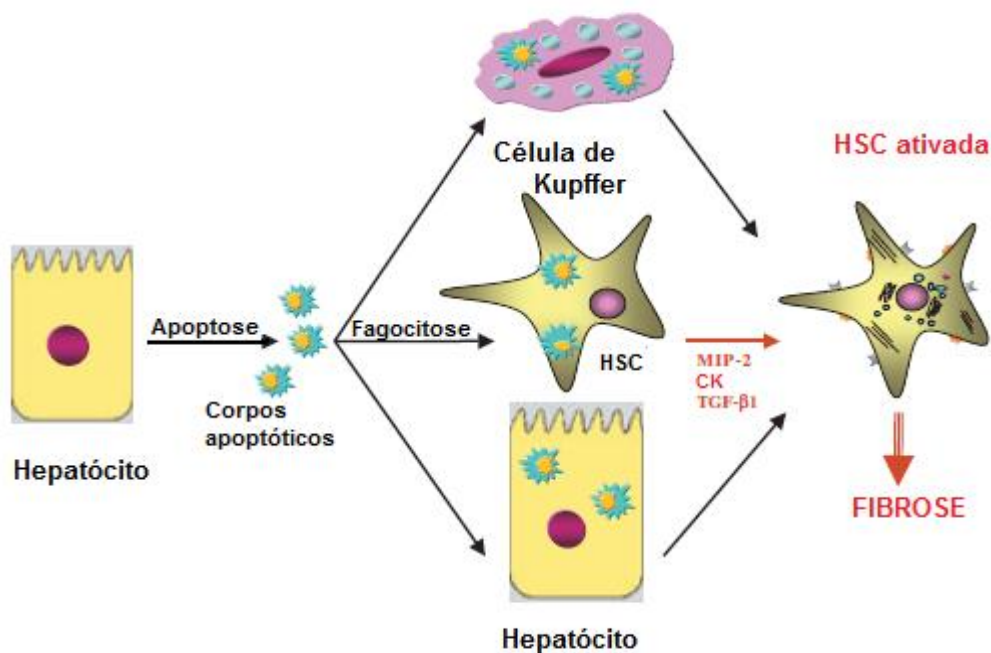
síntese e ação da glutathione nos animais tratados com SNAC. Isto sugere uma menor sobrecarga mitocondrial e uma produção reduzida de ROS, refletindo um efeito antioxidante da SNAC<sup>(73)</sup>. Neste mesmo contexto, Andraus demonstrou em sua tese de doutorado, que SNAC reduziu a lesão hepática após um período de isquemia normotérmica em fígados esteatóticos<sup>(74)</sup>.

## 5. Estímulo a fibrogênese

O dano de I/R com conseqüente EO tem sido implicado como causa de fibrose hepática<sup>(75)</sup>, ocorrendo uma fase citotóxica em que estão envolvidas células endoteliais sinusoidais e hepatócitos. As CK desempenham um papel importante na lesão citotóxica inicial e parecem ser uma fonte de mediadores pró-inflamatórios<sup>(4, 31)</sup>.

A fibrose hepática é uma resposta comum a diferentes mecanismos de lesão crônica e ocorre como consequência da transformação de células estreladas em miofibroblastos com excessiva deposição de matriz extracelular<sup>(76,77, 78, 79)</sup>. Trata-se de um processo dinâmico resultante do depósito excessivo de componentes da matriz extracelular, que envolve as células estreladas hepáticas, CK, citocinas e fatores de crescimento e resulta de um desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos entre síntese e degradação de colágeno<sup>(78,80, 81)</sup>.

Os eventos que se sucedem após o dano hepático, levam a formação de corpos apoptóticos que são fagocitados pelas CK, células estreladas e hepatócitos saudáveis. As CK e as células estreladas liberam citocinas pró-fibrogênicas (TGF- $\beta$ 1, MIP-2 e CK), causando ativação de células estreladas, que vão promover o depósito de colágeno tipo I com conseqüente fibrose<sup>(78)</sup>.



**Figura 2:** Ilustração da ativação da célula estrelada. Fonte: Kisseleva et al, 2007 <sup>(78)</sup> .

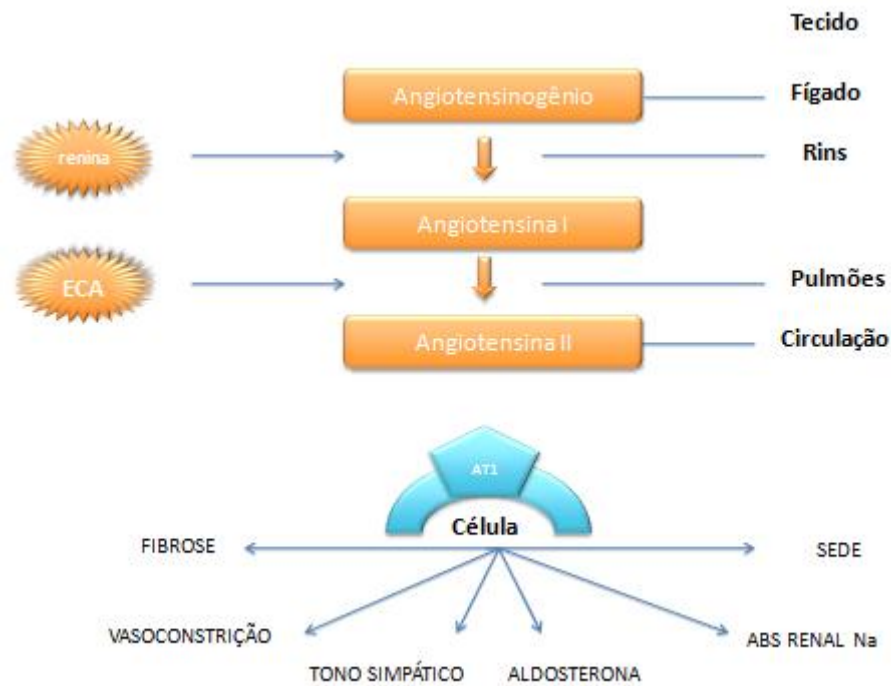
HSC: célula estrelada; MIP-2: proteína inflamatória dos macrófagos; TGF- 1: fator de crescimento 1; CK: células de Kupffer.

A forma mais habitual de avaliação da fibrose é através da histologia hepática. No entanto, testes sorológicos dos produtos da síntese ou degradação da matriz extracelular envolvidos neste processo, têm sido investigados como marcadores de fibrose em muitos estudos<sup>(82,83,84)</sup>. Marcadores bioquímicos não invasivos são utilizados para quantificar o dano tecidual e monitorar a progressão da fibrose<sup>(85,86)</sup>, e a combinação de marcadores séricos da fibrogênese hepática tem sido considerada útil como métodos não invasivos para avaliar a presença de fibrose. Dentre as citocinas envolvidas neste processo, podemos avaliar o TGF-β1 e a angiotensina II através do receptor AT1 por imuno-histoquímica e através da dosagem de renina sérica.

TGF-β1 é sintetizado por células mesenquimais hepáticas e hepatócitos hipóxicos<sup>(76, 87)</sup> e é um potente indutor de fibrogênese nas células efectoras de fibrose hepática<sup>(80,88,89,90)</sup> . Existem 3 tipos: o TGF 1 e TGF 2

são predominantemente expressos pelas CK e o TGF  $\beta$  3 pelas células estreladas. Durante a fibrogênese, a expressão de TGF  $\beta$  2 e TGF  $\beta$  3 está diminuída e a de TGF  $\beta$  1 está significativamente aumentada induzindo a formação de substâncias reativas ao oxigênio, que ativam células estreladas, ocasionando o depósito de colágeno tipo I<sup>(80)</sup>.

O sistema renina-angiotensina é um sistema endócrino de regulação da homeostase da pressão arterial. O precursor angiotensinogênio é sintetizado nos hepatócitos e liberado na circulação, onde é transformado em angiotensina I (ANG-I) pela ação da renina, uma enzima proteolítica sintetizada nos rins. O ANG-I é então desdobrado pela ação da enzima conversora de angiotensina (ACE) para angiotensina II (ANG-II), o principal efetor deste sistema, que sofre estímulo durante lesão aguda ou crônica. O ANG-II produzido promove o recrutamento de células inflamatórias, induz a expressão e secreção de proteínas da matriz extracelular e inibe a degradação do colágeno. Desta forma, atua na fibrogênese dos rins, coração e vasos sanguíneos. Dados recentes têm demonstrado que o sistema renina-angiotensina desempenha um papel importante também na fibrose hepática, exercendo ação contrátil, mitogênica, pró-inflamatória e fibrogênica nas células estreladas que se encontrem ativadas<sup>(91)</sup>. O ANG-II atua em receptor AT1 de angiotensina, promovendo aumento de sua expressão, promovendo ativação de células estreladas quiescentes para miofibroblastos e consequente aumento de colágeno extra-celular<sup>(92,93)</sup>



**Figura 3.** Representação esquemática do sistema renina-angiotensina, onde:

ECA = enzima conversora de angiotensina; ABS Renal Na; absorção renal de sódio Fonte: Lubel JS et al-2008<sup>(93)</sup>

Vários trabalhos em modelo de fibrose induzida em modelos experimentais em ratos tem demonstrado o efeito benéfico do uso de antagonistas do sistema renina-angiotensina que atua sobre receptores AT1 e também promove redução da expressão de TGF- $\beta$ 1, reduzindo a progressão da fibrose hepática<sup>(87,92,93,94)</sup>, demonstrando a importância do estudo destes sistemas.

## **JUSTIFICATIVA**

O TxH é um procedimento de alto custo que visa oferecer melhor qualidade de vida e maior sobrevida em pacientes com várias doenças agudas e crônicas do fígado. O dano de I/R é uma das principais causas de má-função do enxerto precocemente após um TxH e influencia de forma adversa a sobrevida dos pacientes. A utilização de uma solução de preservação efetiva e segura é fundamental durante o período de preservação do órgão a fim de tentar minimizar o dano causado pelo período de isquemia<sup>(53)</sup> reduzindo o dano de I/R e EO.

Como o estímulo à fibrogênese parece estar relacionado ao dano celular hepático, parece relevante estudar a relação entre este estímulo e o dano de I/R. De acordo com nosso conhecimento esta associação, embora interessante, não foi ainda investigada em fase precoce. É isto que justifica e suporta a realização deste estudo.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Avaliar a relação entre dano de I/R e estímulo à fibrogênese.

### **Objetivos específicos:**

- a. Estudar a relação entre dano de I/R por parâmetros bioquímicos e histológicos e fibrogênese através da avaliação da ativação do sistema renina - angiotensina pela dosagem sérica de renina e pela expressão em tecido hepático de receptor AT1 de ANG-II, do Fator Transformador do Crescimento  $\beta$ 1 (TGBF  $\beta$ 1) ;
- b. Avaliar o estresse oxidativo estimado pelas medidas de TBARS, catalase e glutathiona com diferentes soluções (SF, FBP, SNAC 200 e SNAC + UW) e a solução padrão ( UW).
- c. Avaliar a relação entre o estímulo à fibrogênese e a análise de células estreladas através da microscopia eletrônica.
- d. Comparar o estímulo à fibrogênese obtido com diferentes soluções (SF, FBP, SNAC 200 e SNAC + UW) e a solução padrão ( UW).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Desenho do estudo e animais de experimentação**

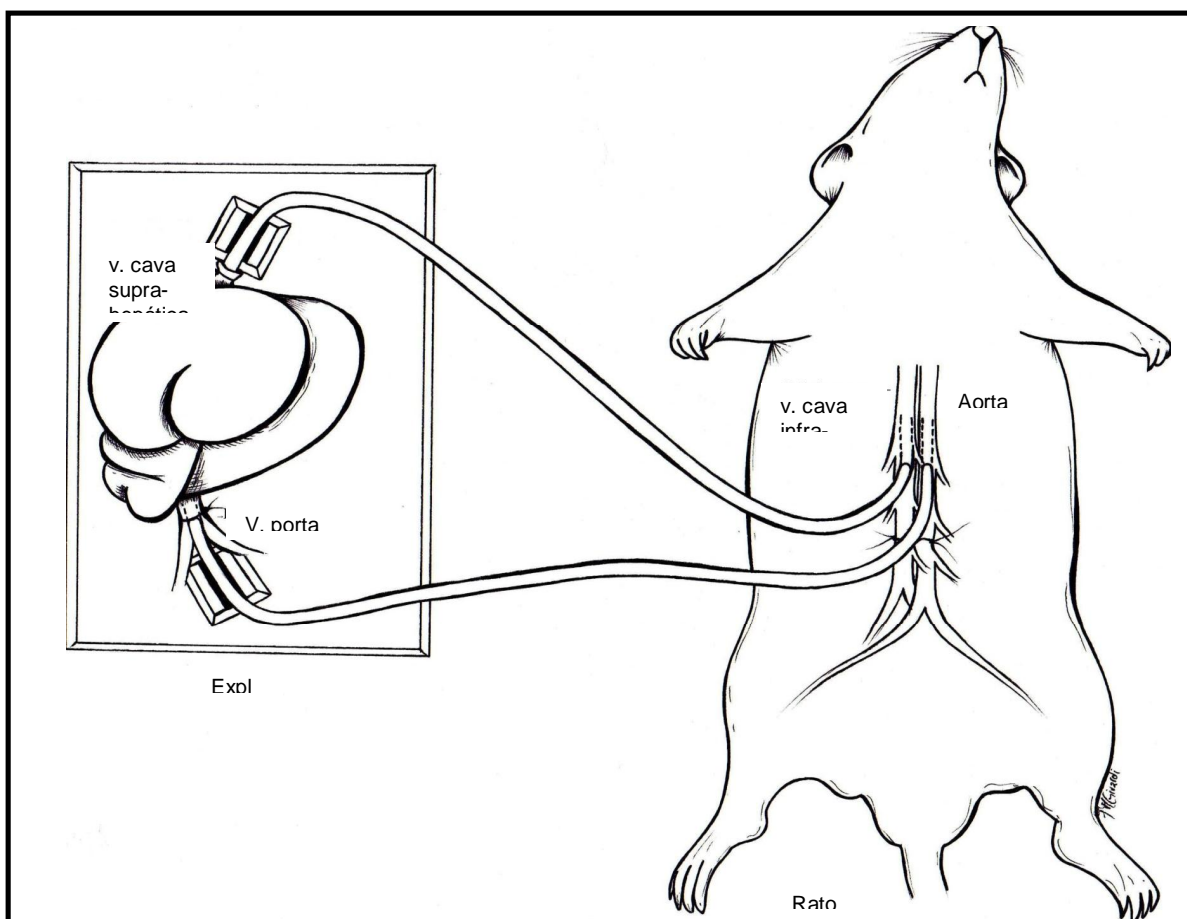
Foi realizado um estudo experimental em 25 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 300 e 530 g, procedentes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os animais foram mantidos em caixas-moradia, confeccionadas em *plexiglass*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem, e submetidos a ciclo normal claro/escuro de 12 h, sendo alimentados *ad libitum* com água e ração padronizada para roedores.

### **2. Procedimentos**

A perfusão e a preservação dos fígados foram realizadas com diferentes soluções, com 5 ratos em cada grupo, a saber: 1) SF 0,9%; 2) UW (Viaspan® Bristol-Myers-Squibb, 1000 mL), com osmolaridade de 320 mOsm/L; 3) FBP (composta de 10 mmol/L de FBP dissolvida em NaCl 0,9%, com osmolaridade de 330 mOsm; 4) SNAC 200 nmol/L; e 5) SNAC 200nmol/L+UW.

A SNAC foi produzida através da S-nitrosação da N-acetilcisteína (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) em uma solução de nitrito de sódio acidificado<sup>(96)</sup>, fornecida pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas . UNICAMP - Campinas, SP) . A solução de SNAC (0,1 mol/L) foi posteriormente diluída em solução salina a 200 nmol/L antes da administração.

O procedimento experimental foi realizado conforme o modelo de reperfusão em fígados de ratos, desenvolvido por estudo anterior do grupo<sup>(97)</sup>. Este modelo é dividido em três etapas sequenciais: 1) hepatectomia do rato doador, 2) estocagem a frio (2-4° C) em uma das soluções de preservação por 6 horas; 3) reperfusão *ex-situ* do fígado preservado com o sangue de outro rato (%rato receptor+) durante 15 minutos (Figura 4). Durante o experimento, o anestésico utilizado foi o isoflurano a 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott - fabricante: Irlanda) por via inalatória. Os animais nos quais houve algum problema de técnica cirúrgica, não foram incluídos na análise dos resultados e foram substituídos.



**Figura 4:** Esquema simplificado do modelo de reperfusão (Adaptado de Pinto Kruehl et al, 2007)<sup>(97)</sup>. O circuito de reperfusão se faz pela via aferente a partir da aorta do receptor até veia porta do rato doador (explante) e a via eferente entre veia supra-hepática do rato doador até veia cava inferior do receptor.

Durante o período de isquemia a frio, foram retiradas alíquotas da solução de preservação em 2, 4 e 6 horas para a determinação de AST, ALT e

LDH; e, após a reperfusão, foi coletada amostra sanguínea do rato receptor através de punção cardíaca também para a dosagem destas enzimas (em analisador Roche-Hitachi®, com reagentes da Roche Diagnostics® -fabricante Alemanha) e dosagem de renina (RENIN MAIA RIA KIT - Adaltis-Itália).

Adicionalmente, foram seccionados fragmentos do fígado reperfundido para as seguintes finalidades: 1) dosagem das TBARS, catalase, e glutatona; 2) análise histopatológica; 3) determinação da expressão de TGF 1 e do receptor receptor AT1 de ANG II por imuno-histoquímica; e 4) avaliação das células estreladas por microscopia eletrônica de transmissão.

### **3. Mensuração de TBARS, catalase e glutatona no tecido hepático**

Para a medida das TBARS, o fragmento hepático foi aquecido com ácido tiobarbitúrico 0,67% e ácido tricloroacético 10% por 15 minutos em banho-maria, sendo a amostra posteriormente refrigerada e centrifugada. O produto corado foi quantificado por espectrofotometria em 535nm, através da técnica descrita por Halliwell & Gutteridge<sup>(98)</sup>.

A atividade da catalase foi determinada através da reação entre tampão fosfato 50mM, de pH neutro, a peróxido de hidrogênio 0,3M, do homogeneizado do tecido hepático, com a leitura realizada em espectrofotômetro de 240nm<sup>(99)</sup>.

O nível de glutatona reduzida no tecido hepático foi avaliado através de uma reação com DTNB (5-5q dithiobis 2-nitro-benzoic acid)<sup>(100)</sup>.

### **4. Análise Histopatológica**

Fragmentos do tecido foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, seccionados a 3µm, e processados em coloração de hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica. As variáveis foram analisadas por

método semi-quantitativo por 2 patologistas, conforme a especificação a seguir:

i) esteatose macro e microgoticular:- 0: <5% hepatócitos; 1: 6-33% hepatócitos; 2: 34-66% hepatócitos; 3: > 66% hepatócitos; ii) balonamento hepatocitário- 0: ausente; 1: leve e focal; 2: leve e generalizado; 3: intenso; iii) neutrofilia- 0: ausente; 1: focal (poucas zonas 3); 2: na maioria das zonas 3; 3: presença de agregados neutrocitários; iv) congestão sinusoidal-0: ausente; 1: focal (alguns ácidos); 2: generalizada; 3: dilatação da vênula hepática terminal; v) necrose-0: ausente; 1: perivenular mínima; 2: perivenular leve.

## **5. Imuno-histoquímica**

A expressão do receptor AT1 de ANG II (Mouse monoclonal [TONI 1] to Angiotensin II type 1 receptor-Novus Biological) e TGF  $\beta$  1 (kit TGF B1 Rabbit polyclonal IGG-Santa Cruz Biotechnology -USA) no tecido hepático após a reperfusão foi detectada por imuno-histoquímica. Dois patologistas independentes analisaram as reações. Nos casos divergentes, as amostras eram reavaliadas, sendo encontrado um consenso. Uma escala semi-quantitativa foi utilizada para análise: 0- ausência de expressão; 1- positividade focal; 2- positividade difusa.

## **6. Microscopia Eletrônica**

A ultra-estrutura das células estreladas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Foram retirados fragmentos aleatórios do lobo direito e esquerdo do fígado reperfundido para avaliação de células estreladas por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram desidratadas, embebidas e inclusas em resina Epon 812. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e nitrato de chumbo. Posteriormente, as amostras foram examinadas utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL-JEM 2010 (200 KeV). Os procedimentos foram realizados

no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

## **7. Tamanho da amostra**

Os parâmetros estatísticos utilizados para o cálculo do tamanho amostral compreenderam um nível de significância (alfa) de 0,05, um poder estatístico de 80%, e um tamanho de efeito padronizado igual a 1, resultando em 5 fígados em cada grupo.

## **8. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 15.0 para Windows. As variáveis quantitativas foram inicialmente avaliadas a cerca de sua distribuição Gaussiana e analisadas através da ANOVA (paramétrica) ou do teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrica). Os resultados da análise histopatológica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica foram apenas descritos devido ao pequeno tamanho da amostra.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil, Lei 6.638 (Diário Oficial da União . 08/05/1979), que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, assim como regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação.

Atendendo a decreto que estipula ser o exercício da medicina de animais de laboratório atividade profissional privativa do Médico Veterinário - Decreto Lei 64.704 de 17/06/1969 (Capítulo II, Art. 2º, itens ~~6º e 6º~~) - de modo que todo o Biotério deve ter Médico Veterinário especializado em animais de laboratório para supervisão do mesmo, o local em que o presente projeto foi realizado contou com a orientação de Médico Veterinário responsável pela UEA.

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados em *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* . ILAR/EUA e Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil), em acordo com o *Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela *International Association for the Study of Pain* (IASP). Estas diretrizes obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*)<sup>(97)</sup>.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **FINANCIAMENTO**

A realização deste trabalho totalizou R\$ 11.644,00 (Onze mil seiscentos e quarenta e quatro reais). As fontes financiadoras foram o FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) do HCPA; verba do Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com uma bolsa de doutorado.

Este projeto foi desenvolvido em conjunto com o Departamento de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e com o Departamento de Biofísica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). A UNICAMP forneceu a SNAC utilizada no estudo, e a PUCRS realizou a dosagem de TBARS, catalase e glutathione, sem custos adicionais.



## **RESULTADOS**

Foram utilizados para a reperfusão 25 fígados: 5 no grupo SF; 5 no grupo UW; 5 no grupo FBP; 5 no grupo SNAC 200; e 5 no grupo SNAC + UW, perfazendo um total de 50 ratos, uma vez que foram utilizados 2 ratos por experimento ( doador e receptor).

O peso do doador, o tempo de isquemia a quente e o tempo de reperfusão foram semelhantes entre os grupos (tabela 1).

**Tabela 1:** Características do procedimento: peso do doador, tempo de isquemia a quente e tempo de reperfusão.

	<b>SF (n=5)</b>	<b>UW (n=5)</b>	<b>FBP (n=5)</b>	<b>SNAC (n=5)</b>	<b>SNAC + UW (n=5)</b>	<b>P</b>
<b>Peso doador (g)</b>	449(±49)	420 (±83)	395(± 64)	441 (±53)	414 (±88)	0,741
<b>Isquemia a quente (min)</b>	44(±12)	64 (±12)	62(15)	52 (±13)	53 (±10)	0,081
<b>Tempo de reperfusão(min)</b>	12(±3)	15(±0,8)	15(±0,4)	15(±0,9)	15(±0,7)	0,064

Os dados estão expressos como média (± desvio padrão). Análise pelo ANOVA, considerando-se significativa um  $p < 0,05$ . SF=soro fisiológico; UW=Universidade de Wisconsin; FBP=fructose- 1,6-bisfosfato;SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína

### **1. Preservação a frio**

Durante a preservação a frio, UW apresentou os maiores médias de liberação de AST, ALT e LDH.

Comparando com UW, AST foi significativamente menor nos grupos SF, FBP e SNAC 200 ( $p=0,001$ ); ALT foi menor no grupo FBP ( $p= 0,023$ ) e LDH foi menor nos grupos FBP e SNAC 200 ( $p=0,007$ ) (tabela 2 e figura 5).

**Tabela 2:** Dosagem de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase no líquido de preservação nos cinco grupos experimentais

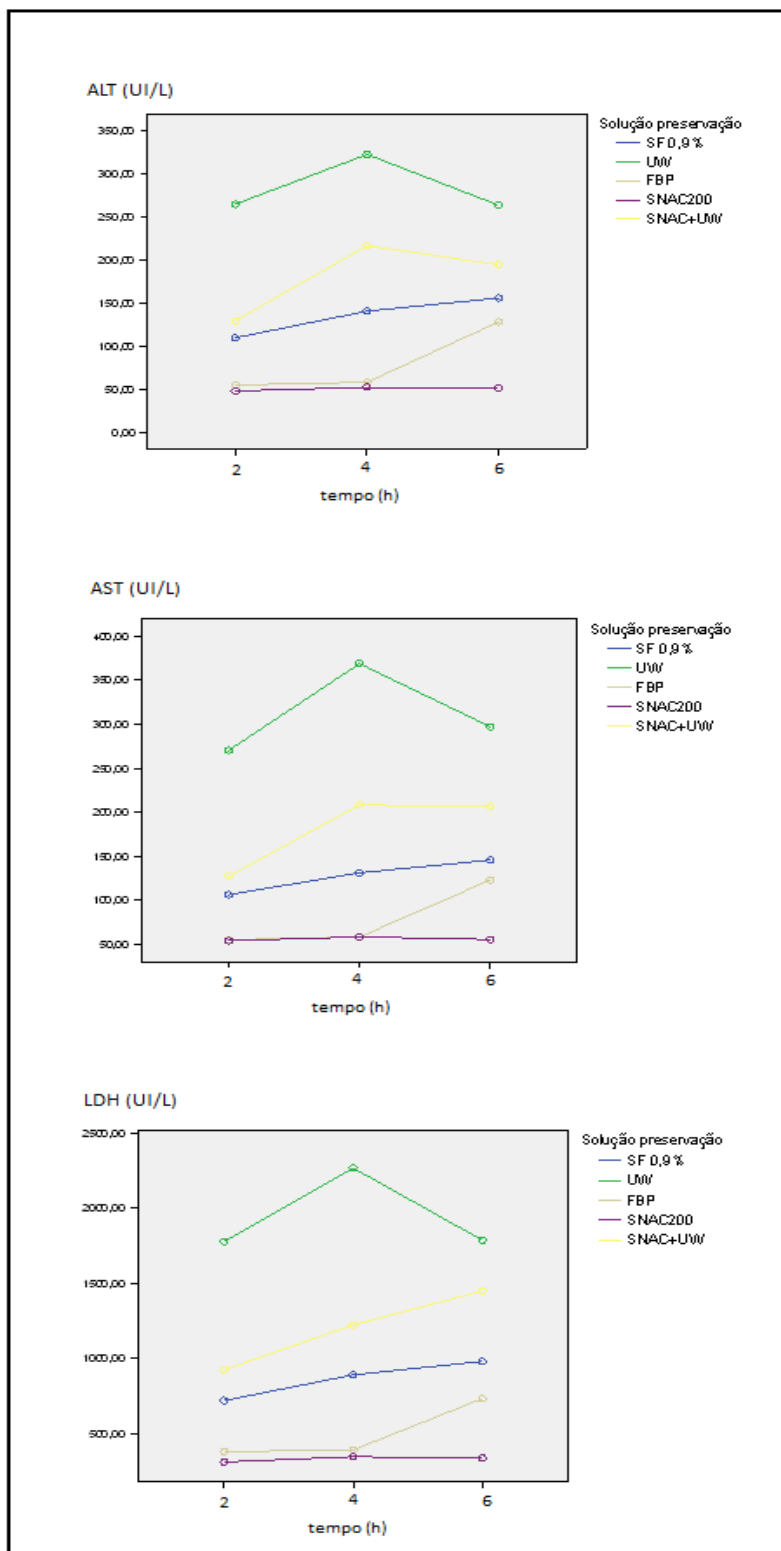
	SF (n=5)	UW (n=5)	FBP (n=5)	SNAC 200 (n=5)	SNAC+UW (n=5)	P
<b>AST -2h</b>	107 (+89)	270 (+131)	55(+36)	54 (+53)	127 (+66)	
<b>4h</b>	131(+99)	369 (+108)	58(+38)	59 (+52)	208 (+132)	
<b>6h</b>	146(+112)	297 (+88)	123(+87)	56 (+51)	206 (+77)	
<b>Média geral±DP</b>	128(+98)	312(+84) *	79(+41)	54(+39)	181(84)	0,001
<b>ALT-2h</b>	109(+87)	265 (+161)	55(+38)	48 (+51)	129(+107)	
<b>4h</b>	140(+111)	322 (+131)	58(+40)	52 (+49)	217 (+211)	
<b>6h</b>	156(+128)	263 (+90)	263(+89)	51 (+51)	194 (+100)	
<b>Média geral±DP</b>	135(+106)	283(+112) **	80(+43)	47(+39)	180(+136)	0,023
<b>LDH-2h</b>	718(+519)	1776(+1086)	379(+288)	309 (+261)	923 (+465)	
<b>4h</b>	889(+853)	2265(+1267)	389(+282)	344 (+259)	1220 (+455)	
<b>6h</b>	978(+738)	1785(+807)	731(+488)	336 (+264)	1448(+522)	
<b>Média geral± DP</b>	862(+614)	1942(+976) ***	500(+287)	316(+195)	1197(+456)	0,007

Os valores estão expressos como média (+ desvio padrão). Análise pelo ANOVA para medidas repetidas, com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas, considerando-se significativo um  $p < 0,05^*$ . Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L. SF=soro fisiológico; UW=Universidade de Wisconsin; FBP=fructose- 1,6-bisfosfato;SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína

\* Diferiu significativamente de dos valores apresentados em SF, FBP e SNAC 200;

\*\* Diferiu significativamente dos valores apresentados em FBP;

\*\*\* Diferiu significativamente dos valores apresentados em FBP e SNAC 200.



**Figura 5.** Níveis de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase no líquido de preservação. Análise pelo ANOVA para medidas repetidas, considerando-se significativo um  $p < 0,05^*$ . Onde: AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L. SF=soro fisiológico; UW=Universidade de Wisconsin; FBP=fructose- 1,6-bisfosfato;SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína

## 2. Reperusão

Após a reperusão, os níveis séricos das enzimas hepáticas (AST, ALT e LDH), e das TBARS não diferiram entre os grupos. Quanto a catalase, os valores de SF e FBP foram significativamente menores que em SNAC+UW maiores ( $p=0,013$ ). Para glutatona houve diferença entre SF, FBP e SNAC 200 com valores menores e UW ( $p=0,004$ ). Em relação a renina, a diferença ficou entre FBP e SNAC 200 ,com menores valores, e SNAC+UW ( $p=0,014$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dosagem de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, catalase, glutatona e renina após a reperusão nos cinco grupos experimentais

	SF (n=5)	UW (n=5)	FBP (n=5)	SNAC 200 (n=5)	SNAC+UW (n=5)	P
<b>ALT (UI/L)</b>	774 (+670)	742 (+296)	1569 (+1816)	962 (+611)	1003 (+1161)	0.733
<b>AST (UI/L)</b>	681 (+422)	959 (+466)	1397 (+1161)	1153 (+694)	823 (+644)	0.587
<b>LDH (UI/L)</b>	6045 (+5997)	6251 (+2276)	9590 (+6799)	7549 (+2921)	7360 (+6119)	0.825
<b>TBARS (nmol/L/gfígado)</b>	70 (+43)	45.2 (+14.3)	68 (+38)	52.2 (+13.5)	47.6 (+25)	0.626
<b>Catalase (U/min/mg)</b>	57 (+21)	80.4 (+14.7)	60 (+7,5)	102.3 (+69.5)	181.8 * (+71.4)	0.013
<b>Glutatona (nmol/L/gfígado)</b>	623 (65-787)	5699** (890-17775)	394 (328-1254)	680 (250-1075.5)	2047 (806.5-2299.5)	0.004
<b>Renina (ng/ml/hora)</b>	17 (±14)	21 (±8)	12 (±6)	16 (±11)	40*** (±15)	0.014

Os valores de glutatona estão expressos em mediana (intervalo interquartilico)- teste de Kruskal-Wallis. As outras variáveis estão descritas como média  $\pm$  desvio-padrão (ANOVA-ONE-WAY) para medidas repetidas com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas).Foram realizadas comparações múltiplas Considerou-se significante um  $p<0,05^*$ . Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L. SF=soro fisiológico; UW=Universidade de Wisconsin; FBP=fructose- 1,6-bisfosfato;SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína

\*Difere significativamente de SF e FBP;

\*\* Difere significativamente de SF, FBP e SNAC 200;

\*\*\* Difere significativamente de FBP e SNAC 200.

### 3. Histopatologia

Nos cinco grupos, não foram encontrados sinais de dano de preservação. Balonização hepatocitária leve focal (Figura 6) e congestão sinusoidal focal (Figura 7) foram documentadas em todas as amostras de UW, SNAC e SNAC + UW. Congestão sinusoidal focal foi encontrada em 1 do SF e nenhum da FBP. Balonização focal foi encontrada em 4 do SF (n=4) e todos do grupo FBP (n=5). Necrose focal foi detectada em 2 fígados preservados com SNAC e 1 no grupo SF (n=1) (figura 8). Em 2 fígados do grupo UW (n=2) ,1, no grupo SNAC+UW (n=1) e 1 no grupo FBP (n=1), observou-se esteatose em menos de 30% dos hepatócitos (figura 9).

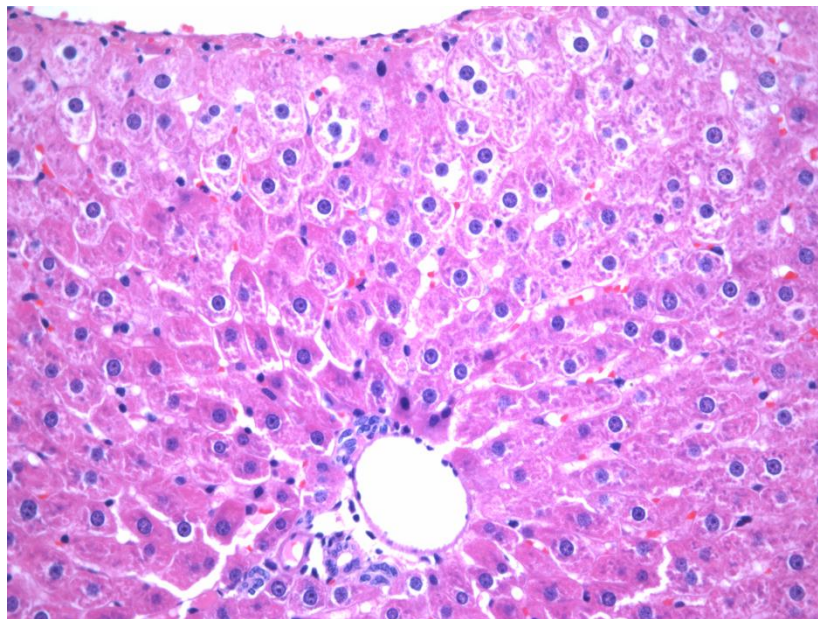


Figura 6. Achados anatomopatológicos das amostras estudadas - balonização hepatocitária focal. Histologia. HE, 200x.

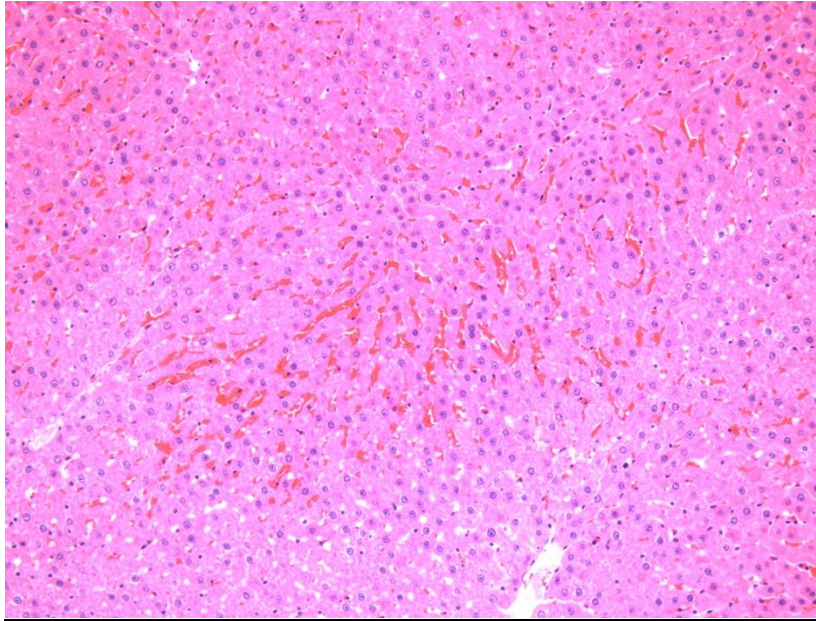


Figura 7. Achados anatomopatológicos das amostras estudadas- congestão hepática leve focal. Histologia. HE, 200x

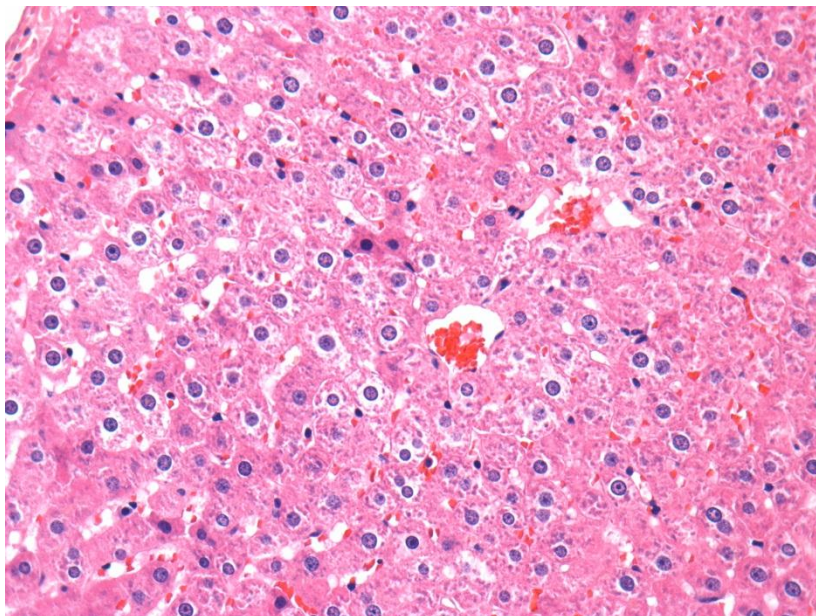


Figura 8. Achados anatomopatológicos das amostras estudadas - necrose focal. Histologia. HE, 200x

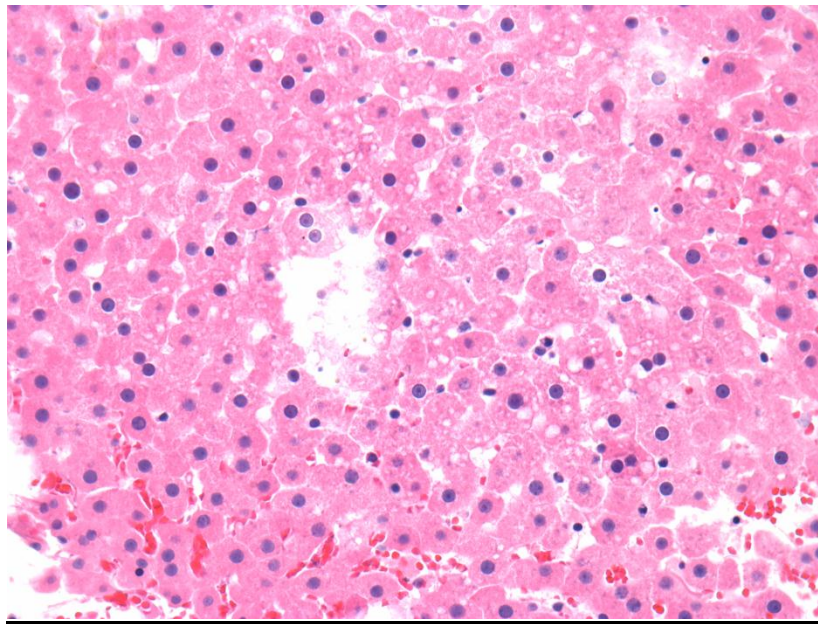


Figura 9 . Achados anatomopatológicos das amostras estudadas . esteatose.

Histologia. HE, 200x

#### **4. Imuno-histoquímica**

A expressão de TGF  $\beta$  1 e receptor AT1 de ANG II não foi detectada em nenhuma amostra estudada. Na Figura 10, está representado um exemplo do kit de imuno-histoquímica de TGF  $\beta$  1 (no estudo e um controle positivo).

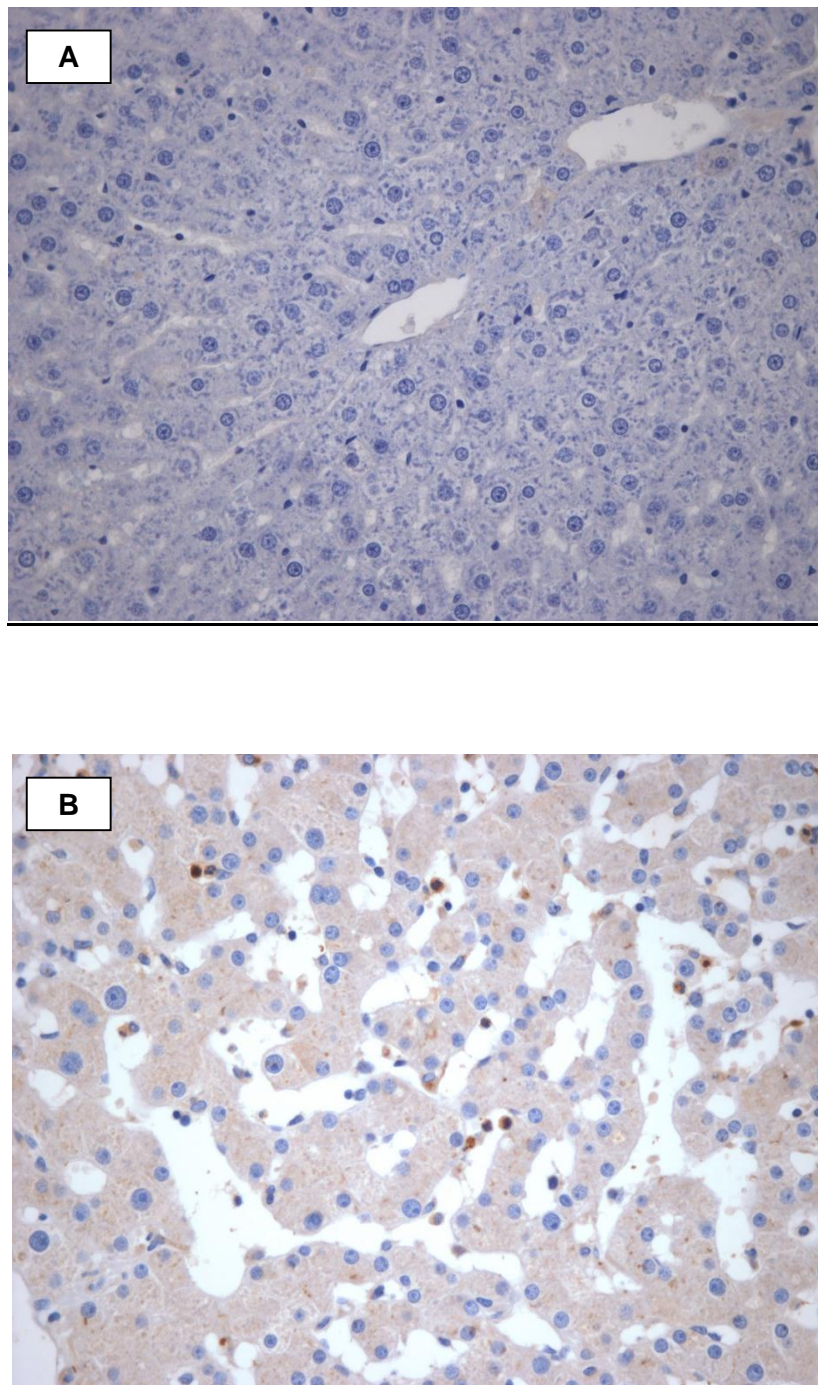


Figura 10. Achados anatomopatológicos das amostras estudadas- imunohistoquímica da expressão de TGF- 1. (A) . estudo; (B) - controle positivo  
Histologia. 400X



## **5. Microscopia eletrônica**

Em todas as amostras estudadas, observou-se que o material não estava adequado para análise em função de má preservação/fixação dos fragmentos hepáticos, o que impediu a identificação das células estreladas.

## **DISCUSSÃO**

### **1. Em relação à linha de pesquisa em isquemia/reperfusão hepática**

O dano de I/R do fígado transplantado é fenômeno complexo e pouco compreendido e contribui para graves complicações nos fígados transplantados como não função primária, disfunção primária e estreitamentos biliares não-anastomóticos<sup>(101)</sup>. Estas complicações permanecem um importante problema na prática clínica, de forma que a redução de seus efeitos pode aumentar tanto o número de enxertos como o de pacientes que se recuperam adequadamente do transplante. O TxH em adultos iniciou no HCPA em 1996. Tendo por base estes anos de experiência clínica, as muitas perguntas deles decorrentes, e as dúvidas ainda existentes na literatura, foi montada uma linha de pesquisa experimental em I/R hepática, com o intuito de averiguar intervenções que pudessem minimizar o dano de I/R. É nesta linha que este estudo se insere.

O principal foco foi, desde o início, o estudo de novas soluções de preservação, haja vista que é na preservação de órgãos onde se encontra o maior espaço para se aprimorar os resultados do TxH. A solução mais utilizada para a preservação de fígados para transplante é a UW. Porém, ela ainda não é a ideal por apresentar custo elevado, alta viscosidade, e não impedir a disfunção primária do enxerto<sup>(102)</sup>. Em 2004, no nosso meio, Moresco estudou

fígados de ratos submetidos a um período de 24 horas de isquemia a frio e comparou 3 soluções (FBP, UW e UW acrescida de FBP), concluindo que a preservação hepática foi melhor no grupo da FBP, um intermediário da rota glicolítica<sup>(68)</sup>. Restava saber, então, se este benefício se mantinha após a reperfusão. Pareceu-nos natural juntar esforços na tentativa de responder a esta questão.

Enquanto eram iniciados os trabalhos na busca de um modelo de reperfusão hepática que incluísse as três fases que se sucedem em um TxH: isquemia a frio, isquemia a quente e reperfusão, o grupo, composto de alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica, passou a estudar o efeito do estado nutricional e da idade do doador na isquemia a frio, comparando UW e FBP e os efeitos dos anestésicos inalatórios isoflurano e sevoflurano na qualidade do fígado do doador<sup>(103)</sup>, sugerindo que a FBP possuía um papel interessante na preservação a frio.

O novo modelo de reperfusão foi concluído, após muitos experimentos, e seus resultados foram publicados em 2007<sup>(97)</sup>. Com a utilização deste novo modelo, pode ser realizado um estudo comparativo entre UW e FBP, cujos resultados demonstraram que novamente a FBP foi superior a UW na preservação a frio, confirmando os achados de Moresco *et al*<sup>(68)</sup>, mas este efeito não se manteve após a reperfusão, quando a solução padrão foi mais efetiva. Quando analisados estudos experimentais publicados acerca da comparação da UW a outras soluções (Tabela 4), vemos que, apesar das limitações conhecidas da solução padrão, ainda não se identificou uma substância que a substitua na preservação de órgãos, de forma que os estudos neste campo de pesquisa ainda são bastantes desafiadores.

Um achado interessante foi que a FBP demonstrou certa proteção mitocondrial após a reperfusão<sup>(59)</sup>. Isto suscitou algumas outras questões: abandonar o estudo da FBP como solução de preservação? Testar outro modelo de reperfusão? Avaliar o estímulo à fibrogênese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias? Procurar novos agentes que possam ser utilizados

como solução de preservação hepática? Por que não estudar o papel de drogas doadoras de NO em um cenário de I/R hepática?

Assim, dois novos estudos foram iniciados, dentro da mesma linha de pesquisa, focando o uso de uma droga doadora de NO, a SNAC, na preservação hepática em ratos, visando avaliar SNAC na prevenção do I/R; comparar SNAC, UW e SNAC+UW que foi apresentado em defesa de doutorado em 2009<sup>(104)</sup>.

O outro estudo utilizando o mesmo modelo é o que está sendo agora apresentado, cujo objetivo foi estudar o efeito de SF, UW, FBP, SNAC e SNAC+UW relacionando com o estímulo a fibrogênese.

**Tabela 4:** Estudos experimentais com diferentes soluções de preservação em comparação com UW.

ESTUDO	SOLUÇÃO	ANIMAL	PROCEDIMENTO	RESULTADOS
<b>Ferrigno et al, 2008</b> <sup>(105)</sup>	Celsior	Ratos Wistar	Isquemia a frio por 18 e 48h	Celsior equiparável à UW até 18h de preservação a frio. UW superior a Celsior após 48 h de isquemia a frio
<b>Ben Mosbah et al, 2006</b> <sup>(106)</sup>	IGL-1	Ratos Zücker	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit <i>like</i> (com adição de albumina 5%)	IGL-1 melhor que UW
<b>Ben Abdennebi et al, 2006</b> <sup>(107)</sup>	IGL-1	Suíños	Transplante hepático	IGL-1 melhor que UW
<b>Cheng et al, 2005</b> <sup>(108)</sup>	CMU-1	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit	CMU-1 semelhante à UW
<b>Fraga, 2005</b> <sup>(104)</sup>	FBP	Ratos Wistar	Preservação a frio- 6h, seguido de reperfusão com sangue por 15 min	FBP inferior à UW, mas com maior proteção mitocondrial que UW
<b>Moresco et al, 2004</b> <sup>(68)</sup>	FBP	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas	FBP melhor que UW
<b>Bessems et al, 2004</b> <sup>(109)</sup>	Hipotermosol	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit	Hipotermosol tão efetivo quanto UW
<b>Straatsburg et al, 2002</b> <sup>(110)</sup>	HTK Celsior	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit	Celsior e UW igualmente efetivas, sendo o efeito da HTK inferior
<b>Presente estudo, 2010</b>	SF,FBP, UW, SNAC200 SNAC + UW	Ratos Wistar	Preservação a frio por 6h Seguida de reperfusão por 15 min	FBP e SNAC 200 superiores a UW

CMU-1= solução da Universidade de Medicina da China; IGL-1= solução do Instituto Georges Lopez; FBP= fructose-1,6-bisfosfato; HTK= histidina-triptofano-cetoglutarato SF=soro fisiológico; UW=Universidade de Wisconsin ;SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína

## 2. Em relação ao desenho do estudo

O TxH ortotópico em ratos é uma técnica muito utilizada no contexto de pesquisa. Os ratos apresentam algumas vantagens sobre outros animais devido a sua ampla viabilidade e baixo custo, apesar de ser requerido vasto treinamento técnico<sup>(111)</sup>. O modelo de reperfusão utilizado neste trabalho foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa como substitutivo ao transplante completo e com a finalidade de se estudar intervenções para amenizar o dano de I/R<sup>(97)</sup>. Este modelo se distancia do TxH e apresenta algumas limitações. A opção por utilizá-lo deveu-se ao fato dele incluir isquemia a frio, isquemia a quente e reperfusão, ao contrário de muitos estudos que avaliam dano de I/R após isquemia normotérmica<sup>(112,113)</sup>. Quando se deseja estudar soluções de preservação, é interessante que seja incluído um período de isquemia a frio, pois a hipotermia, apesar de essencial para a preservação de órgãos, ocasiona também efeitos negativos sobre o enxerto<sup>(114)</sup>. A principal limitação deste modelo consiste no curto período de reperfusão, padronizado em 15 minutos por ser este o tempo em que se consegue manter adequada estabilidade hemodinâmica no rato receptor<sup>(97)</sup>. No entanto, 15 minutos de reperfusão podem ser suficientes, pois os mecanismos de rejeição, embora pouco evidentes, já foram desencadeados<sup>(31,115)</sup>.

Muitos estudos experimentais em TxH utilizam animais isogênicos. Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar pelos motivos expostos a seguir: a) no Brasil, as fontes de animais isogênicos são escassas; b) os ratos isogênicos apresentam alto custo; c) os ratos Wistar, apesar de não idênticos, são geneticamente semelhantes devido a sua consanguinidade; e, por fim, d) o tempo de reperfusão de 15 minutos é curto para ocasionar rejeição. Neste último quesito, é interessante fazer analogia a estudos experimentais em modelos de transplante renal em ratos Wistar, em que, embora a tendência

para rejeição seja maior, por características inerentes ao órgão, os imunossupressores podem ser dispensados nos primeiros 7 dias após o procedimento<sup>(116)</sup>.

Seguindo na mesma linha de pesquisa, estudamos SNAC e SNAC+ UW comparando com FBP, UW e SF. O SF foi escolhido como controle, pois FBP é um pó diluído em SF, a assim saberíamos a ação isolada deste.

A associação entre FBP e UW na mesma solução foi estudada e observou-se que os resultados eram melhores quando usadas isoladamente. Provavelmente, pelo fato de UW ser uma solução de complexa formulação, deve haver interação de algum componente na associação com FBP, causando inativação<sup>(62)</sup>. Desconhecemos existência na literatura de estudo relacionando estas cinco soluções.

SNAC é uma substância doadora de NO<sup>(71)</sup> e potente inibidora da lipoperoxidação lipídica<sup>(72)</sup>, que tem sido estudada em cenários experimentais diversos, tais como hipertensão<sup>(96)</sup>, hipercolesterolemia<sup>(117)</sup>, e na doença hepática gordurosa não alcoólica<sup>(72,73,118)</sup>. Além disso, já foi estudada em modelos de I/R de músculo esquelético<sup>(119,120)</sup> e em fígados esteatóticos, com bons resultados<sup>(74)</sup>. Desta forma, estas características levam a suposição de que SNAC poderia ser útil na preservação de órgãos para transplante, e embasam seu uso em modelos de I/R.

A determinação da atividade das enzimas hepáticas tem sido utilizada para determinar fator prognóstico para funcionamento do órgão e viabilidade do mesmo para transplante. A liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) na solução de preservação pode ser considerada um importante índice para avaliar a qualidade da preservação do órgão<sup>(27)</sup>, sendo um marcador dos danos pré-existentes ou adquiridos durante o período de isquemia<sup>(28)</sup>. Durante a isquemia a frio do fígado doado para transplante, a liberação destas enzimas no líquido de preservação está relacionada ao grau

de lesão hepatocelular mesmo quando ainda não ocorreram alterações anatomopatológicas<sup>(27,28)</sup>. Da mesma forma, elevados níveis de aminotransferases, especialmente de AST, no período imediato pós-transplante se correlacionam com a não função primária do enxerto<sup>(29)</sup>, sendo um dos importantes parâmetros utilizados em TxH para se estimar a intensidade do dano de preservação<sup>(29, 30)</sup>.

O EO que ocorre na reperfusão após o TxH, está relacionado com o dano hepático e conseqüentemente com altas taxas de disfunção do órgão no pós-transplante<sup>(121)</sup>. A dosagem de glutathiona, catalase e TBARS são utilizadas em pesquisa para estimar o EO.

Ao término da reperfusão, foram realizadas biópsias hepáticas. O principal papel da análise histológica neste estudo consiste em demonstrar a homogeneidade das amostras e a efetividade da reperfusão, uma vez que é esperado que 15 min não sejam suficientes para desencadear infiltrado inflamatório ou outras alterações sugestivas de dano de preservação<sup>(18)</sup>. O estímulo a fibrogênese foi estudado através de imuno-histoquímica avaliando-se TGF 1 e receptor AT1 de ANG-II, que fazem parte da cascata que leva à ativação de células estreladas. A dosagem de renina sérica utiliza método corriqueiro da rotina através da coleta de sangue, sendo de baixo custo.

### **3. Resultados durante isquemia a frio**

A discussão destes resultados, comparando as 5 soluções nos leva a recordar resultados de trabalho anterior de nosso grupo<sup>(70)</sup> em que FBP mostrou resultados melhores que UW durante o período de isquemia a frio, assim como Moresco em 2004 já havia demonstrado efeito benéfico da FBP<sup>(68)</sup>. Mota e colaboradores analisaram a preservação de fígados de ratos Wistar idosos durante isquemia a frio, demonstrando uma tendência da FBP ser mais protetora que a UW<sup>(103)</sup>.

No presente estudo, as soluções de SNAC 200 e FBP exerceram maior ação protetora sobre o órgão durante as 6 horas de preservação a frio em comparação a UW e SNAC+UW. Houve diferença estatística para as três variáveis (AST, ALT e LDH), sendo que UW apresentou os maiores valores nas 3. Em relação à LDH, a FBP e SNAC 200 obtiveram menores valores ( $p=0,007$ ), AST com menores valores para SF, FBP e SNAC 200 ( $p=0,001$ ) e para ALT valores menores em FBP ( $p=0,023$ ). Observa-se então, que FBP esteve sempre presente e além dela, também SNAC 200 em AST e LDH.

FBP tem sido reportada como tendo efeito protetor no dano de I/R provavelmente atuando como substrato da rota glicolítica e estabilizando a troca de íons das membranas<sup>(63,68)</sup>. Além disto, ela inibe a produção do iNOS, o óxido nítrico induzível que pode ter efeito tóxico e inibe a geração de radicais livres<sup>(4)</sup>. Estudos utilizando UW associada a FBP, demonstram efeito pior do que na utilização das soluções isoladas. Isto parece se dever ao fato de que a UW possui uma formulação complexa e a FBP provavelmente inativa alguns componentes de sua fórmula. Hirokawa et al demonstrou redução da secreção de citocinas e NO pelas células de Kupffer utilizando associação de FBP e UW modificada com a remoção de glutatona, adenosina, alopurinol e hidroxietilamida<sup>(4)</sup>.

Vários outros estudos em isquemia e reperfusão de outros órgãos demonstram a atenuação do dano de I/R após a administração exógena de FBP<sup>(122,123, 124,1125)</sup>.

O achado de superioridade da SNAC 200 e FBP em relação à UW na preservação de fígados de ratos no período de isquemia a frio é intrigante, mas o desenho dos estudos não permite que sejam feitas considerações acerca dos mecanismos envolvidos. Algumas especulações, entretanto, podem ser realizadas. É conhecido que UW previne os efeitos clássicos da hipotermia (como edema celular, acidose intracelular, piora do metabolismo energético e o acúmulo de ROS), mas apresenta certas características que dificultam a preservação, como a alta viscosidade<sup>(63)</sup>. Acredita-se, portanto, que a menor viscosidade da SNAC 200 e FBP seja uma das propriedades benéficas destas

soluções, de forma a promover a perfusão mais homogênea do órgão, possibilitando uma maior proteção celular e endotelial. O mecanismo de ação protetor da SNAC durante a isquemia a frio ainda permanece obscuro, uma vez que o efeito protetor de NO ocorre principalmente após a reperfusão.

Obtivemos bons resultados com a SNAC, semelhante a FBP. Não há relato prévio de uso da SNAC isoladamente como fizemos. Andraus em sua tese de doutorado<sup>(74)</sup> demonstrou a capacidade de proteção da SNAC sobre os hepatócitos expostos ao dano de I/R. Em seu estudo, foram avaliados ratos com e sem esteatose submetidos à isquemia hepática normotérmica por 60 minutos, tratados ou não com SNAC. Foi analisado o nível das enzimas hepáticas, a histologia, a respiração mitocondrial e o EO (malondialdeído). O tratamento com SNAC não melhorou o dano de I/R em ratos sem esteatose. Por outro lado, os ratos com esteatose tratados com SNAC apresentaram melhor condição anatomopatológica (menos hemorragia intraparenquimatosa), melhor função mitocondrial e menos EO. No trabalho atual, os fígados preservados com SNAC 200 e FBP apresentaram menos lesão hepatocelular durante a isquemia a frio, aferida pelos níveis das enzimas hepáticas no líquido de preservação, mas foram semelhantes à UW após a reperfusão. A associação de SNAC+UW não foi superior a SNAC 200 pura, e a explicação provavelmente se deve ao mesmo fator que causa piores resultados da associação FBP com UW, por inativação de algum componente.

#### **4. Em relação aos resultados após a reperfusão:**

A busca por solução de preservação ideal tem levado os pesquisadores a fazer associações variadas, muitas vezes com a retirada de componentes de uma solução como no caso da UW.

Observa-se que em determinadas fases da preservação do órgão no TxH, obtêm-se melhores resultados de uma solução em detrimento da outra, mas muitas vezes tal achado não se mantém no período da reperfusão.



Nossos resultados demonstram que na reperfusão, os níveis de AST,ALT,LDH e TBARS são semelhantes entre os grupos, no entanto, os níveis de catalase e renina foram maiores no grupo SNAC+ UW, sendo que SF e FBP foram menores na catalase ( $p= 0,013$ ) e FBP e SNAC 200 menores na renina ( $p=0,014$ ). Em relação a glutatona, observamos níveis superiores em UW em relação a SF, SNAC 200 e FBP ( $p=0,004$ ).

A associação de UW com outras substâncias para preservação de órgãos já foi estudada. Chegou-se a conclusão de que a preservação é pior nestes casos, provavelmente ocasionado pela inativação de componentes da UW, como a associação de FBP com UW<sup>(64)</sup>. Em nosso estudo, observamos que a associação UW+SNAC parece ter ocasionado maior EO e maior estímulo a fibrogênese, pois foi o grupo que apresentou maiores valores de catalase e renina.

Sabendo-se que a catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio produzido durante o EO, o seu aumento mostra que a associação UW+SNAC não foi benéfica, e a FBP e SF demonstraram efeito protetor melhor,sendo que estudos anteriores demonstravam bons resultados na isquemia a frio de FBP<sup>(68-70)</sup>, que não se mantinham no período de reperfusão<sup>(70)</sup>. Este resultado, embora esteja restrito a catalase não tendo ocorrido com TBARS, ALT, AST e LDH, nos leva a pensar que FBP com todos os seus efeitos descritos benéficos na proteção do órgão<sup>(67,68,69,70)</sup>, deve ter seu estudo estimulado, pois além disto também demonstrou menor estímulo a fibrogênese, com menores níveis de renina neste grupo. Estudos já foram realizados com o uso endovenoso de FBP para tentar definir a quantidade que poderia ser tóxica para ratos<sup>(67)</sup>. Usualmente, são utilizados 10nmol/L, no entanto, questionamos se concentrações diferentes poderia nos dar resultados melhores.

Interessante, surpreendente e aparentemente sem uma explicação clara, foi o resultado obtido com SF, que esteve relacionado a níveis menores de catalase em comparação a UW, da mesma forma que FBP. O efeito benéfico da FBP já havia sido demonstrado por nosso grupo<sup>(70)</sup>. Será que este

efeito se deve à diluição de FBP em SF, que é o procedimento padrão, e a solução salina teria alguma ação antioxidante? Isto não deve explicar tudo, pois SNAC 200 foi também empregada em solução salina, sem os mesmos resultados. Outros estudos seguindo esta mesma linha poderão desvendar melhor estas questões. Há possibilidade de interações entre tais soluções com mudança de sua ação final.

Avaliando-se a glutathiona, observamos que SF, FBP e SNAC 200 mostraram níveis significativamente menores, comparando com UW. O grupo da UW apresentou níveis bastante elevados em comparação aos demais, seguido de UW+SNAC. Esta diferença tão grande, pode se dever ao fato de que UW já tem glutathiona em sua fórmula o que nos mostra que devemos ter cuidado nas conclusões sobre glutathiona para avaliação do EO, embora SF, FBP e SNAC 200 tenham mostrado um efeito protetor.

Quando o tecido hepático foi avaliado, não foram encontrados indícios de dano de preservação, como esperado, uma vez que as alterações costumam se tornar evidentes 60-90 minutos após a reperfusão<sup>(31)</sup>. Os achados histológicos foram semelhantes nos 5 grupos, com leve congestão sinusoidal, o que documenta um bom fluxo sanguíneo intra-hepático durante o processo de reperfusão, além da ausência de lesão significativa nas CES.

A cascata do processo de fibrogênese, que pode ocorrer, mesmo em fase precoce no dano de I/R, pode ser avaliada de forma experimental. É mais dispendiosa e complexa, estudando-se citocinas como TGF 1 e receptor AT1 de ANG-II. É mais simples e barata através da dosagem de renina no soro.

Os níveis de renina foram menores nos grupos SNAC e FBP, sendo que novamente FBP demonstrou melhor proteção quanto ao estímulo a fibrogênese. Mas a SNAC também demonstrou resultados semelhantes, assim como em vários outros trabalhos, cada um avaliando um tipo de efeito benéfico da SNAC<sup>(72,73,74)</sup>. Portanto SNAC isolada, demonstrou um efeito protetor, sendo que em nosso grupo, foi observado efeito protetor no período de isquemia a frio quando avaliadas variáveis como AST e LDH<sup>(70)</sup>.

O estudo da renina mostrou resultado bastante interessante, pois inicialmente havia muito entusiasmo com a avaliação das citocinas por imunohistoquímica e na realidade os resultados da renina é que foram promissores . Isto parece estar de acordo com o fato de que a renina atua sobre angiotensinogênio no início da cascata da fibrogênese e a ação sobre receptor AT1 de ANG-II é mais tardia.

Neste estudo, não foi detectada a expressão de TGF  $\beta$  1 em nenhuma amostra, reforçando a idéia de que provavelmente ocorreu mínimo dano de preservação em todos os grupos. Além disso, a falta de expressão de TGF  $\beta$  1 pode ser reflexo do modelo escolhido, que limita a reperfusão em apenas 15 minutos. Cabe ressaltar que o kit foi testado em amostras controle com sucesso. Quanto ao kit do receptor AT1 de ANG II, infelizmente não houve expressão nem em nosso material estudado e nem nas amostras controle, o que nos impossibilitou de relacionar estes resultados com os da renina sérica, o que teria sido muito interessante. O material utilizado era próprio para estudo em ratos por imunohistoquímica segundo o fabricante e não sabemos porque isto ocorreu.

Na análise da ultra-estrutura das células estreladas por microscopia eletrônica, não foi possível identificá-las. As amostras foram revisadas por patologista experiente, que considerou, como provável causa da inadequação das amostras para análise, ter havido fixação inadequada das peças. Talvez este fato pudesse ter sido evitado, se as análises fossem feitas no decorrer da coleta de material, em que detectaríamos a inadequação precocemente, uma vez que se trata de procedimento extremamente delicado e especializado, havendo portanto dificuldades muitas vezes, na obtenção de uma orientação sistemática adequada.

Em resumo, neste modelo experimental de dano de reperfusão precoce, o dano de preservação promoveu elevação na atividade da renina, o primeiro passo para fibrogênese. FBP e SNAC 200 foram superiores à UW na preservação a frio de fígados de ratos e na reperfusão sanguínea no modelo estudado com certa superioridade de FBP.

## 5. Limitações do estudo

Dentro das especificações deste estudo, e a luz dos resultados obtidos, talvez a principal limitação seja o tempo de reperfusão de 15 minutos. Seria ele suficiente para desencadear dano de I/R? Provavelmente seria este tempo insuficiente para podermos estudar por imuno-histoquímica as citocinas TGF  $\beta$  1 e receptor AT1 de ANG II.

## 6. Possíveis aplicações futuras

Considerando o desenho deste estudo, seus achados e limitações, é possível que sejam consideradas algumas aplicações futuras.

- a) O modelo de I/R utilizado deveria ser aperfeiçoado para que o período de reperfusão fosse ampliado o mais próximo possível dos 60 minutos. Esta tarefa, no entanto, não parece fácil quando considerado o seu uso em ratos Wistar. Estratégias para controle e manutenção do estado hemodinâmico do animal seriam bem-vindas, antes que o modelo fosse aplicado a animais de maior porte, o que envolve custos mais elevados;
- b) O modelo, como está, presta-se mais a detecção de dano precoce de I/R, e a tentativa de demonstração de lesão da ultra-estrutura das células estreladas talvez deva ser novamente perseguida;
- c) A análise do perfil da expressão gênica em fígados preservados com UW, FBP e SNAC pode um ser campo interessante de pesquisa, podendo contribuir na compreensão dos mecanismos de ação de tais soluções;
- d) Seguir procurando concentração ideal e associações entre estas soluções espacialmente FBP e SNAC, incluindo UW modificada;

- e) Estudos com acompanhamento pós-operatório dos animais submetidos a transplante parecem ser necessários para que se tenha um cenário mais próximo à realidade clínica e para que se possa comparar o efeito da SNAC, FBP e UW nas fases de I/R, e seu papel no alívio das lesões inerentes ao TxH, bem como avaliar o seu uso em modelos de simulação de complicações vasculares que costumam ocorrer no pós-transplante.
  
- f) Os resultados com a renina devem estimular a sua utilização para tentar prever resultados a curto e longo prazo inclusive em estudos em humanos transplantados, dada a sua simplicidade, baixo custo e realização na rotina dos serviços;

## **CONCLUSÕES**

De acordo com os métodos utilizados neste estudo e os resultados obtidos no mesmo, podem ser enunciadas as seguintes conclusões:

- 1) Houve relação entre o dano de isquemia e reperfusão e o estímulo à fibrogênese aferido pelos níveis séricos de renina
- 2) A solução de fructose-1,6-bisfosfato e o soro fisiológico, demonstraram melhor proteção ao estresse oxidativo levando em consideração os níveis de catalase, em comparação à solução da Universidade de Wisconsin.
- 3) A ultra-estrutura das células estreladas não pode ser avaliada adequadamente;
- 4) As soluções de fructose-1,6-bisfosfato e S-nitroso-N-acetilsisteína 200 nmol, ocasionaram menor estímulo a fibrogênese em comparação à solução da Universidade de Wisconsin.

## REFERÊNCIAS

1. Van der Hoeven JA, Lindell S, Van Suylichem PT, et al. Extended preservation and effect of nitric oxide production in liver transplantation. *Transpl Int* 1998;11(1):171.
2. Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. *Acta Cir Bras* 2004; 19(1):3.
3. Cassilas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006 ;(79):1881.
4. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; 74 (6):779.
5. Langnas AW, Howard T. Debate: venovenous bypass vs caval preservation. American Association for the Study of Liver Disease & The International Liver Transplantation Society. Postgraduate course: Recurrent liver disease after liver transplantation diagnosis and management. 1996; 99.
6. Wiesner RH, Rakela J, Ishitani MB, Mulligan DC, Spivey JR et al. Recent advances in liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 2003; (78): 197.
7. Gastaca M. Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient. *Transplant Proc* 2009;41:975.
8. Macedo G, Lopes S, Maia JC , Veloso FT. Tratamento e profilaxia da recidiva nos doentes com cirrose pelo vírus da hepatite B em lista para transplante hepático. *GE-J Port Gastro* 2004;11:199.
9. Herrero JI, De La Peña A, Quiroga J, Sangro B, Garcia N, et al. Risk Factors for recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl Surg*. 1998;4:265.
10. Prieto M, Berenguer M, Rayón JM, Córdoba J, Arguello L, et al. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b following transplantation: Relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1998;29: 250.

11. Berenguer M, Prieto M, Cordoba J, Rayón JM, Carrasco D, et al. .Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation association with treatment of rejection. *J Hepatol* 1998; 118:756.
12. Zimmermann T, Otto C, Hope-Lotichius M, Biesterfeld S, Lautem A, et al. Risk factors in patients with rapid recurrent hepatitis C virus-related cirrhosis within 1 year after liver transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41:2549.
13. Phillips MJ, Cameron R, Flowers MA, Blendis LM, Greig PD, et al. Post-transplant recurrent hepatitis B viral liver disease. Viral-burden, steatoviral, and fibroviral hepatitis B. *Am J Pathol* 1992; 140: 1295.
14. Carrasco L, Sanchez-Bueno F, Sola J, Ruiz JM, Ramirez ZP, et al. Effects of cold ischemia time on the graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. *Transplantation* 1996 ; 61(3): 393.
15. Shackleton CR. Upregulation of major histocompatibility complex-expression under ischemic conditions in experimental models. *Transplant Proc* 1998 ; 30(8): 4264.
16. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, MacMasters KM, Edwardos MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32(2):169.
17. Haga S, Remington JS, Morita N, Terui K, Ozaki M. Hepatic ischemia induced immediate oxidative stress after reperfusion and determined the severity of the reperfusion-induced damage. *Antiox Redox Signal* 2009; 11(10):2563.
18. Gaffey MJ, Boyd JC, Traweek ST, et al. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25 (1): 184.
19. Rosen HR, Medden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology* 1999 ; 29(2): 365.
20. Baron PW, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Goltfried MR, et al. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000 ; 6(4): 407.
21. Strasberg SM. Preservation injury and donor selection: it all starts here. *Liver Transpl Surg* 1997; 3 (5 Suppl 1): S1.



22. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30 (8): 4217.
23. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Do L, Al-Massarani G, Descamps G, et al. Hepatic cytoprotection by nitric oxide and the cGMP pathway after ischaemia-reperfusion in the rat. *Nitric Oxide* 2003; 9:57.
24. Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, Katayama T, Tsutsui H, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol* 2005; 517: 232.
25. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007; 27 (1):6.
26. Romanque P, Uribe M, Videla LA. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico. *Rev Med Chil* 2005; 133:469.
27. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; 46 (4): 512.
28. Lange R, Erhard J, Rauen U, de Groot H, Eigler FW. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; 62 (9): 1255.
29. Rosen HR, Madden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology* 1999; 29 (2): 365.
30. Álvares-da-Silva MR. A influência do dano de isquemia/reperfusão na função do enxerto e na evolução imediata em pacientes submetidos a transplante hepático- o papel da biópsia de reperfusão. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
31. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18 (8): 891.
32. De Oliveira CP. Perfusão hepática e estresse oxidativo.. FUGESP. Revista de Hepatologia Morfologia hepática (aspectos de interesse clínico) maio/junho 2000.
33. Sener G, Tosun O, Ozer Sehirli A, Kaçmaz A, Arbak S, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003; 72:2707.

34. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury (review). *Br J Surg* 1994; 81:637.
35. Del Maestro R, Thaw III, Bjork J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 1980; Suppl 492: 43.
36. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:515.
37. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras* 1997; 43(1): 61.
38. Burke A, Fitzgerald GA, Lucey MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 217.
39. Rhoden EL, Maurim M, Petteffi L, Belló-Klein A, Kalil AN, et al. Efeito da reperfusão na lesão tecidual causada por radicais livres em ratos submetidos à isquemia hepática. *GED* 1996; 15: 49-52.
40. Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousseklot D, Cristol L JP, et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris)* 1998; 56: 305.
41. Belló-Klein A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: Marroni NP. *Estresse Oxidativo e antioxidantes*. Editora da ULBRA, Canoas 2002 : 15-9.
42. Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1872.
43. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61:319.
44. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003; 9 (1): 1.
45. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999; 30 (1): 1.
46. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997; 100 (11): 2923.
47. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411 (2-3): 217.

48. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999; 43 (3): 509.
49. Mari M, Norales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antiox Redox Signal* 2009; 11(11): 2685.
50. Barraviera B, Machado, Abreu PE. Glutathione reductase and reacting SH groups in erithrocites: a review. *Arq Bras Med* 1989,63:131.
51. Toledo-Pereya LH. Organ preservation and ischemic injury. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:125.
52. Maathuis MKJ, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007; 83(10):1289.
53. El-Wahsh M. Liver graft preservation : an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6:12.
54. Belzer F, Southard J. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673.
55. Anaya-Prado R, Delgado-Vázquez. Scientific basis of organ preservation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:129.
56. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996 ; 25(5): 774.
57. Garrera JV, Karim NA. Liver preservation: is there anything new yet? *Current Opinion in Organ Transplant* 2008; 13:148.
58. Southard J, Belzer F. Principles of organ preservation. In: Busuttil R, Klintmalm, BB, ed. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 379.
59. Kahn D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomatic biliary strictures [correction of structures]? *HPB Surg* 1996; 9 (2): 113.
60. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28 (2): 281.
61. Natori S, Selzner M, Valentino KL, *et al*. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999; 68 (1): 89.

62. Moresco RN, Santos RCV, Alves Filho JCF, De Oliveira JR. Effect of fructose-1,6 Bisphosphate in the cold storage solution after 12 and 36 hours of rat liver preservation. *Transplant Proc* 2004;36:2593.
63. Feng XN, XU X , KHENG SS. Current status and perspective of liver preservation solutions. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006;5:490.
64. Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, et al. Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution (HTK) and University of Wiscosin Solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver transpl* 2006; 12:226.
65. Lopez-Andajur R, Deusa S, Montalvá E, San Juan F, Moya A, et al. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions:University of Wiscosin and Celsior. *Liver Transplant* 2009; 15:1709.
66. Markow AK, Oglethorse NC, Blacke TM, Lehan PH, Hellems HK. Hemodynamic, electrocardiografic, and metabolic effects of fructose biphosphate on acute myocardial ischemia. *Am Heart J* 1980; 100(5): 639.
67. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, *et al.* An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; 47 (1): 35.
68. Moresco RN, Santos RC, Alves Filho JC, *et al.* Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36 (5): 1261.
69. Nunes FB, Simoes Pires MG, Alves Filho JC, Wachter PH, Rodrigues De Oliveira J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30 (9): 2069.
70. Fraga RS. Comparação entre fructose -1,6-bisfosfato e solução da Universidade de Wisconsin na preservação de fígados de ratos: a proteção contra o dano precoce isquemia/reperfusão. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
71. Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Rossi R. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta* 2003; 330 (1-2): 85.
72. de Oliveira CP, Simplicio FI, de Lima VM, *et al.* Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (12): 1905.

73. de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, *et al.* Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol* 2006; 45 (5): 725.
74. Andraus W. Estudo do efeito da S-nitroso-N-acetilcisteína na lesão de isquemia/reperfusão em fígado esteatótico de ratos. Clínica Cirúrgica. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2007.
75. Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, *et al.* Interferon-enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Med Invest* 2002; 49: 172.
76. Jeong WII, Do S-H, Yun HS, Song BJ, Kim SJ, *etal.* Hypoxia potentiates transforming growth factor- expression of hepatocyte during the cirrhotic condition in rat liver. *Liver Int* 2004. 24:658.
77. Jiang HQ, Zhang XL, Liu L, Yang CC. Relationship between focal adhesion kinase and hepatic stellate cell proliferation during rat hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10 (20):3001.
78. Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(supl 1): S73.
79. Cheng F, Li Y, Feng L, Li S. Hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis induced by ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2008; 40:2167.
80. Pereira RM, Souza dos Santos RA, Da Costa Dias FL, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2009; 15 (21):2579.
81. Moreno M, Battaler R. Cytokines and rennin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12:825.
82. Rosenberg WMC, Volker M, Thiel R, Becka M, Burt A, *et al* on behalf of the European Liver. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127: 1704.
83. Kim CW, Yoon SK, Jo BS, Shin JY, Jang JW, *et al.* Predictions of hepatic fibrosis using serum hyaluronic acid in patients with chronic liver disease. *Korean . J Gastroenterol* 2003;42: 510.

84. Tsukamoto T, Yamamoto T, Ikebe T, Takemura S, Shuto T, et al. Serum markers of liver fibrosis and histologic severity of fibrosis in resected liver. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:777-78.
85. Lu LG, Zeng MD, Wan MB, Li CZ, Mao YM, et al. Grading and staging of hepatic fibrosis, and its relationship with noninvasive diagnostic parameters. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2574.
86. Serejo F, Costa A, Oliveira AG, Ramalho FR, Batista A, et al. Alpha-interferon improves liver fibrosis in chronic hepatitis C : clinical significance of the serum N-terminal propeptide of procollagen type III. *Dig Dis Sci* 2001;46:1684.
87. Jonsson JR, Clouston AD, Ando Y, Kelemen LI, Horn MJ, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2001;121:148.
88. Schuppan D, Krebs A, Hahn EG. Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ* 2003;10:559.
89. Zhang L, Yang Z, Shi BM, Li DP, FANG CY, et al. Expression of local rennin and angiotensinogen mRNA in cirrhotic portal hypertension patient. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1584.
90. Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner A. Activation of liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. *J Clin Invest* 1992; 89:19.
91. Battaller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, et al. Activated human hepatic stellate cells express the rennin-angiotensin system and synthesize Angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125:117.
92. Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, et al. The regulatory role of AT1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCL4. *World J Gastroenterol* 2000;6(6):824.
93. Lubel JS, Herath CB, Burrell LM, Angus PW. Liver disease and the rennin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1327.
94. Iwata K, Sohda T, Irie M, Takeiama Y, Anan A, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist improves the prognosis in rats displaying liver cirrhosis induced by a choline-deficient diet. *J Gastrointest Liver Dis* 2008;17:21.
95. Xia CY, Li L, Liu HM, Cong WM. High expression of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 in preservation injury after liver transplantation in rats. *Hepatology Research* 2009; 39:1118.

96. Ricardo KF, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* 2002; 7 (1): 57.
97. Pinto Kruel CR, Scherer de Fraga R, Dal Molin S, et al. Hepatic reperfusion in rats: a new model with portal arterialization in studying early ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007; 39 (10): 3015.
98. Halliwell B GJ. *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
99. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds. *Methods of enzymatic analysis*. Nova York, 1986: 273.
100. Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988; 175 (2): 408.
101. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995; 1 (2): 124.
102. Upadhyaya GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 2000; 31 (5): 1115.
103. Mota SM, Gasperin G, Cerski CTS, Oliveira JRd, Álvares-da-Silva MR. Ageing and its impact on the quality of grafts: an experimental study in rat livers. *Archives of Gastroenterology* in press.
104. Fraga RS. S-Nitroso-N-Acetilisteína (SNAC) na preservação de fígado de ratos: análise do seu efeito no dano precoce de isquemia/reperfusão. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
105. Ferrigno A, Tartaglia A, Di Nucci A, et al. Further studies on long-term preservation of rat liver: Celsior versus UW solution. *In Vivo* 2008; 22 (6): 681.
106. Ben Mosbah I, Rosello-Catafau J, Franco-Gou R, et al. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transpl* 2006; 12 (8): 1215.
107. Ben Abdennebi H, Elrassi Z, Scoazec JY, Steghens JP, Ramella-Virieux S, Boillot O. Evaluation of IGL-1 preservation solution using an orthotopic liver transplantation model. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (33): 5326.

108. Cheng Y, Liu YF, Cheng DH, Li BF, Zhao N. Evaluation of CMU-1 preservation solutions using an isolated perfused rat liver model. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (16): 2522.
109. Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol. *Ann Transplant* 2004; 9 (2): 35.
110. Straatsburg IH, Abrahamse SL, Song SW, Hartman RJ, Van Gulik TM. Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after cold storage using UW, HTK, and Celsior. *Transplantation* 2002; 74 (4): 458.
111. Lausada NR, Gondolesi GE, Ortiz E, Dreizzen E, Raimondi JC. [Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2002; 32 (2): 63.
112. Cursio R, Colosetti P, Auberger P, Gugenheim J. Liver apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion: in vivo evaluation of caspase activity by FLIVO assay in rats. *Transplant Proc* 2008; 40 (6): 2038.
113. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, *et al.* Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford)* 2007; 9 (2): 112.
114. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003; 125 (3): 917.
115. Ayoub T AK. Liver transplant anesthesia: an update. *Curr Opin Organ Transplant* 2003; 8: 252.
116. Waynforth H, Flecknell P. Experimental and surgical technique in the rat. Second ed. New York: Academic Press Hacount Brace Favanovich, 1992.
117. Garcia JA, dos Santos L, Moura AL, *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 51 (1): 78.
118. de Oliveira CP, de Lima VM, Simplicio FI, *et al.* Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *J Am Coll Nutr* 2008; 27 (2): 299.
119. Liu K, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. S-nitroso-N-acetylcysteine protects skeletal muscle against reperfusion injury. *Microsurgery* 1998; 18 (5): 299.



120. Chou CH, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Effect of a nitric oxide donor on microcirculation of acutely denervated skeletal muscle during reperfusion. *J Reconstr Microsurg* 2002; 18 (1): 53.
121. Grezzana TJM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, et al. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplant Proc* 2004: in press.
122. Markow AK. Hemodynamic and metabolic effects of fructose 1-6 diphosphate in ischemia and shock- experimental and clinical observation. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 1470.
123. Sun J, Farias LA, Markov AK. Fructose-1,6-disphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and deaths in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 117.
124. Sano W, Watanabe F, Tamai H, Furuya E, Mino M. Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 1995; 108: 1785.
125. Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose -1,6- bisphosphate. *Free Radic Res* 1992; 16: 325.

## **ANEXOS**

**Anexo 1 - Dados Brutos**

RATO	pesodoa	indução1	tcirdoa	aortasol	portasol	retirada	isquente	reperf	pesorec	pesofig	isodoa	isorec	indução2
1	445,00	3	33	0,0	50,0		41	15	451,00	22,27	20	10	10
4	498,00	4	62	50,0	50,0	10	36	16	342,00	19,11	10	10	2
5	451,00	8	40	50,0	50,0	25	39	8	410,00	19,40	10	10	6
6	485,00	5	64	49,0	49,0	14	57	15	444,00	19,90	10	10	23
7	313,00	3	53	50,0	50,0		48	15	360,00	11,17			10
8	366,00	9	58	50,0	50,0	10	79	15	349,00	11,60	10		4
9	358,00	5	41	50,0	50,0	10	70	15	351,00	11,72			11
11	345,00	3	43	50,0	50,0	8	61	14	360,00	12,66	10		3
12	358,00	11	64	50,0	50,0	22	79	15	378,00	13,30	20	15	8
13	359,00	6	47	50,0	50,0	15	72	15	339,00	15,84	10	10	2
14	412,00	3	48	50,0	50,0		57	15	368,00	17,42	10	10	16
15	500,00	3	36	50,0	50,0	7	41	15	400,00		10	10	2
16	500,00	3	39	50,0	50,0	8	74	13	500,00		10	10	3
17	481,00	4	50	50,0	50,0	11	64	10	468,00	20,50	10	10	3
18	370,00	4	38	50,0	50,0	12	38	12	402,00	14,90	10	10	7
19	394,00	7	63	50,0	50,0	9	44	15	453,00	16,03	10	10	5
20	492,00	3	27	50,0	50,0	7	40	15	410,00	19,80	10	10	4
23	404,00	4	43	50,0	50,0	9	46	15	421,00	15,60	15	10	5
25	412,00	2	44	50,0	50,0	6	71	13	520,00	23,00	10	10	
32	505,00	2	45	50,0	50,0	10	59	15	468,00	19,00	20	15	2
33	452,00	2	45	50,0	50,0	9	62	15	492,00	16,40	10	10	3
35	507,00	4	26	50,0	50,0	11	43	16	580,00	17,49	10	10	2
36	468,00	4	32	50,0	50,0	9	44	15	424,00	18,00	10	10	4
37	349,00	4	45	50,0	50,0	9	63	14	244,00	13,80			4
38	296,00	2	43	50,0	50,0	15	54	15	264,00	11,17			5
25	412,00	2	44	50,0	50,0	6	71	13	520,00	23,00	10	10	
32	505,00	2	45	50,0	50,0	10	59	15	468,00	19,00	20	15	2
33	452,00	2	45	50,0	50,0	9	62	15	492,00	16,40	10	10	3
35	507,00	4	26	50,0	50,0	11	43	16	580,00	17,49	10	10	2
36	468,00	4	32	50,0	50,0	9	44	15	424,00	18,00	10	10	4
37	349,00	4	45	50,0	50,0	9	63	14	244,00	13,80			4
38	296,00	2	43	50,0	50,0	15	54	15	264,00	11,17			5

RATO	solução	ast2	ast4	ast6	astsoro	alt2	alt4	alt6	altsoro	ldh2	ldh4	ldh6	ldhsoro	renina
1	1,00	21,00	24,00	25,00	1.335,00	31,00	37,00	35,00	1.804,00	240,00	275,00	278,00	14.747,00	25,00
4	1,00	242,00	265,00	290,00	358,00	242,00	266,00	290,00	55,00	1.472,00	1.494,00	1.618,00	1.973,00	
5	1,00	95,00	189,00	222,00	627,00	129,00	249,00	294,00	883,00	880,00	1.633,00	1.881,00		
6	2,00	255,00	291,00	436,00	800,00	238,00	263,00	391,00	314,00	1.799,00	1.958,00	2.753,00	6.417,00	25,00
7	2,00	489,00	554,00	315,00	1.672,00	491,00	505,00	272,00	821,00	2.207,00	2.330,00	1.381,00	7.703,00	6,39
8	2,00	148,00	361,00	243,00	1.169,00	96,00	237,00	165,00	965,00	653,00	1.400,00	1.041,00	6.555,00	25,00
9	2,00	194,00	293,00	288,00	572,00	142,00	195,00	193,00	578,00	877,00	1.239,00	1.189,00	2.405,00	25,00
11	3,00	41,00	37,00	260,00	943,00	41,00	36,00	282,00	812,00	292,00	268,00	1.472,00	6.640,00	
12	3,00	24,00	27,00	76,00	3.346,00	20,00	23,00	74,00	4.742,00	117,00	119,00	346,00	20.995,00	4,46
13	3,00	24,00	30,00	37,00	543,00	21,00	28,00	36,00	479,00	139,00	184,00	233,00	4.096,00	12,49
14	3,00	88,00	87,00	90,00	603,00	98,00	96,00	104,00	416,00	786,00	762,00	806,00	5.706,00	20,36
15	3,00	100,00	111,00	153,00	1.549,00	93,00	106,00	144,00	1.400,00	561,00	612,00	799,00	10.515,00	12,49
16	2,00	266,00	345,00	204,00	582,00	356,00	412,00	296,00	1.033,00	3.346,00	4.396,00	2.559,00	8.175,00	25,00
17	1,00	140,00	130,00	141,00	809,00	114,00	107,00	114,00	809,00	780,00	732,00	795,00	5.291,00	1,18
18	1,00	35,00	49,00	51,00	278,00	31,00	43,00	45,00	320,00	217,00	312,00	320,00	2.170,00	25,00
19	7,00	115,00	118,00	114,00	1.335,00	106,00	109,00	110,00	1.196,00	611,00	642,00	640,00	10.178,00	2,38
20	7,00	26,00	33,00	31,00	1.121,00	18,00	27,00	23,00	594,00	164,00	225,00	209,00	8.676,00	25,00
23	7,00	22,00	25,00	22,00	369,00	19,00	20,00	20,00	452,00	153,00	166,00	160,00	2.907,00	25,00
25	7,00	75,00	64,00		2.204,00	69,00	60,00		1.931,00	399,00	362,00		9.408,00	
32	7,00	33,00		32,00	735,00	22,00		22,00	638,00	211,00		212,00	6.578,00	10,84
33	11,00	152,00	159,00	218,00	583,00	138,00	150,00	223,00	596,00	1.019,00	1.065,00	1.638,00	5.753,00	50,00
35	11,00	125,00	202,00	289,00	110,00	89,00	168,00	223,00	76,00	855,00	1.435,00	1.871,00	725,00	32,55
36	11,00	80,00	150,00	169,00		63,00	100,00	124,00		659,00	1.030,00	1.184,00		50,00
37	11,00	224,00	435,00	260,00	1.635,00	310,00	589,00	330,00	2.703,00	1.656,00	1.883,00	1.883,00	15.466,00	17,29
38	11,00	56,00	96,00	96,00	965,00	45,00	76,00	71,00	639,00	428,00	689,00	662,00	7.496,00	50,00

RATO	catalase	glutaciona	TBARS	Congestao	esteatose	neutrofilia
1	59,00	623,00	89,60	2,00	0,00	0,00
4	38,60	787,00	52,90	2,00	0,00	0,00
5	85,50	630,00	136,70	2,00	0,00	0,00
6	89,70	13.535,00	40,00	1,00	0,00	0,00
7	100,30	4.025,00	38,50	1,00	0,00	0,00
8	71,20	17.755,00	49,70	0,00	0,00	1,00
9	63,60	4.557,00	67,50	1,00	1,00	0,00
11	68,60	1.254,00	121,10	2,00	0,00	1,00
12	65,50	756,00	32,00	2,00	0,00	1,00
13	50,50	328,00	93,70	2,00	1,00	0,00
14	61,40	380,00	42,70	2,00	0,00	0,00
15	54,60	394,00	51,70	2,00	0,00	0,00
16	77,30	6.841,00	30,20	1,00	1,00	0,00
17	35,60	65,00	40,40	2,00	0,00	0,00
18	68,80	309,00	3,20	1,00	0,00	0,00
19	71,20	338,00	69,50	1,00	0,00	0,00
20	58,30	1.456,00	56,40	2,00	0,00	0,00
23	29,10	680,00	32,70	1,00	0,00	1,00
25	173,00	162,00	55,00	1,00	0,00	0,00
32	180,00	695,00	47,20	1,00	0,00	1,00
33	281,00	1.027,00	83,30	1,00	0,00	0,00
35	144,00	586,00	64,80	2,00	0,00	0,00
36	135,00	2.428,00	27,40	1,00	0,00	0,00
37	233,00	2.047,00	30,80	1,00	2,00	0,00
38	116,00	2.171,00	31,60	1,00	0,00	0,00

## **ANEXO 2 - DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS**

**pesodoa**= peso do rato doador, em gramas

**indução1**= tempo de indução anestésica no rato doador, em minutos

**tcirdoa**= tempo de cirurgia do doador, em minutos

**aortasol**= volume de solução de preservação infundida na aorta, em ml

**portasol**= volume de solução de preservação infundida na veia porta, em ml

**retirada**= tempo de hepatectomia no rato doador após infusão da solução, em minutos

**isquente**= tempo de isquemia a quente do órgão, em minutos

**reperf**= tempo de reperfusão, em minutos

**pesorec**= peso do rato receptor, em gramas

**pesofig**= peso do fígado após reperfusão, em gramas

**isodoa**= volume de isoflurano administrado ao rato doador, em ml

**isorec**= volume de isoflurano administrado ao rato receptor, em ml

**indução2**= tempo de indução anestésica no rato receptor, em minutos

**solução**= solução de preservação utilizada, conforme especificado:

2= UW

7= SNAC

11= SNAC+UW

**ast2**= nível de AST no líquido de preservação após 2 horas de isquemia a frio, em UI/L

**ast4**= nível de AST no líquido de preservação após 4 horas de isquemia a frio, em UI/L

**ast6**= nível de AST no líquido de preservação após 6 horas de isquemia a frio, em UI/L

**astsoro**= nível de AST no soro após a reperfusão, em UI/L

**alt2**= nível de ALT no líquido de preservação após 2 horas de isquemia a frio, em UI/L

**alt4**= nível de ALT no líquido de preservação após 4 horas de isquemia a frio, em UI/L

**alt6**= nível de ALT no líquido de preservação após 6 horas de isquemia a frio, em UI/L

**altsoro**= nível de ALT no soro após a reperfusão, em UI/L

**ldh2**= nível de LDH no líquido de preservação após 2 horas de isquemia a frio, em UI/L

**ldh4**= nível de LDH no líquido de preservação após 4 horas de isquemia a frio, em UI/L

**ldh6**= nível de LDH no líquido de preservação após 6 horas de isquemia a frio, em UI/L

**ldhsoro**= nível de LDH no soro após a reperfusão, em UI/L

**catalase**= nível da catalase no tecido hepático após a reperfusão, em U/min/mg

**glutaciona**= nível da glutaciona no tecido hepático após a reperfusão, em nmol/L/g de fígado

**TBARS**= nível de TBARS no tecido hepático após a reperfusão, em nmol/L/g de fígado

**congestão**= congestão sinusoidal, conforme graduação estabelecida (materiais e métodos)

**esteatose**= esteatose hepática, conforme graduação estabelecida (materiais e métodos)

**neutrofilia**= neutrofilia em tecido hepático, conforme graduação estabelecida (materiais e métodos)

**balonização**= balonamento hepatocitário, conforme graduação estabelecida (materiais e métodos)

**necrose**= necrose em hepatócitos, conforme graduação estabelecida (materiais e métodos)