

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**  
**CURSO DE DOUTORADO**

**HIPOTERMIA HEPÁTICA TÓPICA ASSOCIADA AO PRÉ-CONDICIONAMENTO  
ISQUÊMICO: ANÁLISE DOS DANOS HEPATOCELULARES, FUNÇÃO HEPÁTICA E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM  
RATOS**

**Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho**  
**Orientador: Prof. Dr. Carlos Otavio Corso**

**TESE DE DOUTORADO**

**Porto Alegre**

**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**  
**CURSO DE DOUTORADO**

**HIPOTERMIA HEPÁTICA TÓPICA ASSOCIADA AO PRÉ-CONDICIONAMENTO  
ISQUÊMICO: ANÁLISE DOS DANOS HEPATOCELULARES, FUNÇÃO HEPÁTICA E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM  
RATOS**

**Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Otavio Corso**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Cirurgia como pré-  
requisito obrigatório para a obtenção do título  
de doutor em Medicina: Cirurgia.**

**TESE DE DOUTORADO**

**Porto Alegre**

**2009**

## **Dedicatória**

*À Andréa, minha amada companheira de todos os momentos, meu símbolo de coragem, de carinho e de ternura.*

*Ao meu filho Thiago, a quem espero transmitir o equilíbrio necessário para uma vida feliz e lhe mostrar que o conhecimento é um bem precioso que abre portas inimagináveis.*

*Aos meus pais, Tomaz (in memoriam) e Marlize, meus exemplos concretos e os pilares de toda a minha formação.*

*A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria.*

***Tomás de Aquino***

## **Agradecimentos**

A realização de um trabalho científico é o fruto do esforço interligado de muitos profissionais, os quais muitas vezes trabalham silenciosamente e permanecem no anonimato. Sem eles, o conhecimento não poderia se expandir. Por isso, agradeço a todos os colegas que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

Gostaria de manifestar meu apreço e gratidão à Professora Roseli Möllercke (*in memoriam*), que não poupou esforços para oferecer as condições logísticas para a realização dos experimentos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Agradeço também à veterinária Fabíola Schons Meyer e aos biólogos Eduardo Mottola Amaro da Silveira e Tânia Peres, profissionais solícitos e imprescindíveis no que diz respeito à manutenção, manuseio e anestesia dos animais. Também devo agradecer à técnica Flávia Rejane Giusti Grossmann, responsável pelo preparo das lâminas para a análise histopatológica, e ao Professor Carlos Thadeu Cerski, que realizou a referida análise. Não menos importantes foram os funcionários do Centro de Pesquisas do HCPA, fundamentais na formulação e adequação dos orçamentos e armazenamento das amostras.

Expresso minha sincera gratidão à Professora Norma Anair Possa Marroni e às biólogas Graziella Rodrigues e Silvia Bona, responsáveis pelas medidas dos marcadores teciduais, e à Professora Carmem Pilla e sua equipe, que realizaram as mensurações plasmáticas.

Agradeço ao Fundo de Incentivo de Pesquisa e Eventos (FIPE) pelo apoio financeiro que permitiu que este trabalho fosse concretizado, a todos os funcionários do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA e aos membros do Curso de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em particular à secretária Estela Maris Araripe, atuante no cumprimento das regras estipuladas pelo curso.

Manifesto minha gratidão de forma muito especial pelo inestimável auxílio da acadêmica da Faculdade de Medicina Tais Burmann de Mendonça, que com total desprendimento e curiosidade científica, atuou em todos os experimentos como auxiliar e foi também responsável pela coleta das amostras e confecção do banco de dados. Por fim, meu profundo e sincero agradecimento ao Professor Carlos Otavio Corso pela motivação, espírito científico e pela sua disponibilidade e entusiasmo permanentes.

# Sumário

|   |    |
|---|----|
| Dedicatória .....   | 3  |
| Agradecimentos .....  | 5  |
| Lista de Abreviaturas.....  | 9  |
| Lista de Figuras .....  | 11 |
| Lista de Tabelas.....   | 14 |
| Resumo .....  | 15 |
| Abstract.....   | 16 |
| 1. Introdução.....  | 17 |
| 1.1 Isquemia e Reperusão Hepática, Pré-condicionamento Isquêmico e Hipotermia ..... | 17 |
| 2. Revisão da Literatura.....   | 20 |
| 2.1 Técnicas de Indução de Hipotermia em Cirurgia Hepática.....                     | 20 |
| 2.2 Hipotermia Hepática: Mecanismos de Ação e Estresse Oxidativo .....              | 23 |
| 2.3 Hipotermia Hepática: Resposta Inflamatória .....                                | 28 |
| 2.4 Pré-condicionamento Isquêmico: Mecanismos de Ação.....                          | 34 |
| 2.5. Efeitos do PCI sobre o Estresse Oxidativo.....                                 | 36 |
| 2.6 Efeitos do PCI sobre o Metabolismo Energético.....                              | 39 |
| 2.7 Efeitos do PCI Sobre a Microcirculação Hepática .....                           | 41 |
| 2.8 Efeitos do PCI na resposta Inflamatória Local e Sistêmica.....                  | 42 |
| 2.9 O PCI e as Vias de Sinalização Hepatoprotetoras.....                            | 44 |
| 2.10 O PCI em Estudos Clínicos .....  | 45 |
| 3. Referências Bibliográficas.....  | 49 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 4. Objetivos.....                     | 57 |
| 5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....     | 58 |
| 6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS ..... | 84 |



## **Lista de Abreviaturas**

ADP – Adenina Difosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

AMP - Adenosina Monofosfato

AP-1 - Activated Protein 1

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

CAT - Catalase

ET-1 - Endothelin 1

Gpx - Glutaciona Peroxidase

GSH/GSSG - Glutaciona reduzida/glutaciona oxidada

HO-1 - Hemeoxigenase 1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

HSP - Heat Shock Proteins

ICAM -1 Intercelular Adhesion Molecule 1

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$

IL-6 - Interleucina 6

L-NAME - N-nitro-L-arginina metil ester

MDA - Malondialdeído

MAPK- Mitogen Activated Protein Kinase

MPO - Mieloperoxidase

NAC - N-acetilcisteína

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase

NF- $\kappa$ B - Nuclear Factor kappa B

NOS - Nitric Oxide Sintetase

ON - Óxido Nítrico

PCI - Pré-condicionamento Isquêmico

PKC - Protein Kinase C

RLO - Radicais Livres de Oxigênio

SOD - Superóxido Dismutase

TNF- $\alpha$  - Tumor Nuclear Factor  $\alpha$

TBARS - Metabólitos do Ácido Tiobarbitúrico

## **Lista de Figuras**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Mecanismos relacionados aos danos de isquemia e reperfusão no fígado. ....                                 | 18 |
| Figura 2: Mecanismo de produção de RLO pela ação da Xantina Oxidase. ....  | 25 |
| Figura 3: Bases moleculares do PCI. Diagrama representando os mecanismos responsáveis pela indução de proteção. .... | 35 |

## Lista de Figuras do Artigo Original em Inglês:

Figure 1: Overall view of the experiment. Animal subjected to partial liver ischemia and topical hypothermia. Yellow arrow: bile flow collection. Orange arrow: rectal thermometer. White arrow: cold saline superfusion on the liver. Green arrow: ischemic liver lobes. Red arrow: carotid catheter. Blue arrow: oxygen by face mask..... 74

Figure 2: Ischemia of the liver lobes. Green arrow: Bile ducts of the median and left lateral lobes not included in the cross-clamping. Yellow arrow: catheter introduced into the mean bile duct. Blue arrow: microclipe occluding the vascular pedicle to median and left lateral lobes. White arrow: ischemic left lateral lobe. .... 74

Figure 3: Ischemic liver lobes placed into a concave shaped device. Green arrow: superfusion of saline on the liver lobes. Yellow arrow: intraparenchymal probe connected to a digital thermometer..... 75

Figure 4: Induction of topical liver hypothermia. Green arrow: Suction system. Yellow arrow: Cold saline superfusion on the ischemic liver lobes. White arrow: Ischemic liver lobes placed into a specially designed device. .... 75

Figure 5: (A) AST levels at the end of reperfusion.  $*P<0.05$  vs. C. (B) ALT levels at the end of reperfusion.  $*P<0.05$  vs. C. Data expressed as Mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Tukey post hoc test..... 76

Figure 6: Ischemia substantially reduces bile flow from the bilateral median and left lateral liver lobes. After reperfusion there was a recovery of bile flows in H+IPC and H groups (see the text).  $*P<0.05$  vs. NI and IPC. Data expressed as Mean  $\pm$  SEM, One-way ANOVA, Tukey post hoc test..... 77

Figure 7: TBARS levels at the end of reperfusion.  $^+P<0.05$  vs. C,  $*P<0.05$  vs. H+IPC,  $^{\#}P<0.01$  vs. H+IPC. Data expressed as Mean  $\pm$  SEM. ANOVA on ranks, Dunn post hoc test..... 78

Figure 8: Catalase levels at the end of reperfusion.  $*P<0.05$  vs. IPC,  $^{\#}P<0.01$  vs. IPC. Data are expressed as Mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Student-Neumann-Keuls post hoc test. .... 78

Figure 9: Superoxide dismutase levels at the end of reperfusion.  $^{\#}P=0.01$  vs. H,  $*P<0.05$  vs. H. Data are expressed as Mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Student-Neuman-Keuls post hoc test. .. 79

Figure 10: Histopathological score injuries. HE sections were evaluated to the presence of hydropic degeneration (0-4), hepatocellular necrosis (0-4) and neutrophilic infiltrates (0-4). Data are presented as Mean  $\pm$  SEM.  $*P<0.05$  vs. C. One-way ANOVA, Tukey post hoc test..... 79

## Lista de Figuras do Artigo Original em Português:

- Figura 1: Visão geral do experimento. Animal submetido a isquemia parcial do fígado e hipotermia tópica. Seta amarela: coleta de bile. Seta laranja: termômetro retal. Seta branca: gotejamento de solução fisiológica sobre o fígado. Seta verde: lobos hepáticos isquêmicos. Seta vermelha: cateter carotídeo. Seta azul: oxigênio por máscara facial..... 100
- Figura 2: Lobos hepáticos isquêmicos posicionados dentro de um dispositivo côncavo. Seta verde: gotejamento de solução fisiológica sobre os lobos isquêmicos. Seta amarela: probe intraparenquimatoso conectado ao termômetro digital. .... 101
- Figura 3: Lobos hepáticos isquêmicos posicionados dentro de um dispositivo côncavo. Seta verde: gotejamento de solução fisiológica sobre os lobos isquêmicos. Seta amarela: probe intraparenquimatoso conectado ao termômetro digital ..... 100
- Figura 4: Indução de hipotermia hepática tópica. Seta verde: Sistema de aspiração. Seta amarela: Gotejamento de solução fisiológica gelada sobre os lobos hepáticos isquêmicos. Seta branca: Lobos hepáticos posicionados dentro de dispositivo especialmente confeccionado..... 101
- Figura 5: Atividade da AST ao término da reperfusão.  $*P<0,05$  vs. *IN* e  $P<0,05$  vs. *PCI*. (B) Atividade da ALT ao término da reperfusão.  $*P<0,05$  vs. *IN* e  $P<0,05$  vs. *PCI*. *Dados expressos como Médias ± EP. One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações* ..... 102
- Figura 6: A isquemia reduziu substancialmente o fluxo biliar dos lobos mediano e lateral esquerdo. Após a reperfusão houve recuperação do fluxo biliar nos grupos H e H+PCI (veja o texto).  $*P<0,05$  vs. *IN* e *PCI*, respectivamente. *Dados expressos como Média ± EP. One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações.* .....103
- Figura 7: Níveis de TBARS ao término da reperfusão.  $*P<0,05$  vs. *H+PCI*,  $\#P<0,01$  vs. *H+PCI* e *H*. *Dados expressos como Média ± EP. Kruskal-Wallis, teste de Dunn para múltiplas comparações* ..... 104
- Figura 8: Níveis de Catalase ao término da reperfusão.  $*P<0,05$  vs. *PCI*,  $\#P=0,01$  vs. *PCI*. *Dados expressos como Média ± EP. One-way ANOVA, teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações* ..... 104
- Figura 9: Níveis de SOD ao término da reperfusão.  $\#P=0,01$  vs. *H*,  $*P<0,05$  vs. *H*. *Dados expressos como Média ± EP. One-way ANOVA, teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações* ..... 105
- Figura 10: Escore de danos histopatológicos. *Cortes corados com HE foram avaliados para a presença de degeneração hidrópica (0-4), necrose hepatocelular (0-4) e infiltrados neutrofílicos (0-4). Dados expressos como Média ± EP. Houve diferença significativa entre os grupos IN e C.  $*P<0,05$ . One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações* ..... 105

## **Lista de Tabelas**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Mecanismos de proteção contra a lesão de isquemia e reperfusão induzidos pelo Pré-condicionamento Isquêmico..... | 36 |
|--|----|

### **Tabelas do Artigo Original em Inglês**

|   |    |
|---|----|
| Table 1: Bile flow rates throughout ischemia ( $\mu\text{l/g}\cdot\text{min}$ ) ..... | 67 |
|---|----|

### **Tabelas do Artigo Original em Português**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Fluxo biliar durante a isquemia ( $\mu\text{l/g}\cdot\text{min}$ )..... | 93 |
|---|----|

## Resumo

**Introdução:** O uso de Hipotermia Tópica ou Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI) em ressecções hepáticas pode ser útil com o propósito de atenuar os danos de isquemia e reperfusão. Entretanto, até o presente momento, o uso combinado destas técnicas não foi avaliado.

**Objetivos:** Desenvolver um modelo experimental para avaliar os danos de isquemia e reperfusão iniciais e a ocorrência de efeitos sinérgicos quando as duas ferramentas são aplicadas concomitantemente.

**Métodos:** Realizou-se isquemia do fígado por noventa minutos e reperfusão por cento e vinte minutos. Os animais foram divididos nos grupos Controle (C), Isquemia Normotérmica (IN), Pré-condicionamento Isquêmico (PCI), Hipotermia 26°C (H) e Hipotermia 26°C + PCI (H+PCI). Foram avaliados a Pressão Arterial Média (PAM), a temperatura corporal e o fluxo biliar a cada 15 minutos, enquanto a ALT, AST, TBARS, SOD, CAT e os danos histopatológicos foram avaliados ao término da reperfusão.

**Resultados:** Não foram observadas alterações na PAM e na temperatura corporal durante todo o experimento. O fluxo biliar retornou a valores semelhantes ao grupo C nos grupos H e H+PCI após 45 minutos de reperfusão, e foi significativamente maior nos grupos H e H+PCI em comparação aos grupos IN e PCI após 105 minutos ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) e 120 minutos ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) de reperfusão. Os níveis plasmáticos da AST e ALT demonstraram aumento significativo nos grupos IN ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) e PCI ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) em comparação ao grupo C. Os níveis de TBARS foram significativamente maiores nos grupos IN ( $P<0,01$ ), PCI e H ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) em comparação ao grupo H+PCI e significativamente maiores no grupo IN em comparação ao grupo C ( $P<0,05$ ). No grupo H houve correlação negativa entre AST e ALT com o fluxo biliar ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) e positiva entre AST e ALT com os níveis de TBARS ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ). Os níveis de CAT demonstraram aumento significativo no grupo PCI em comparação aos grupos C ( $P<0,01$ ), IN e H+PCI ( $P<0,05$  e  $p<0,05$ ), enquanto os níveis de SOD foram significativamente maiores no grupo H em comparação ao grupo C ( $P=0,01$ ), IN, PCI e H+PCI ( $P<0,05$ , respectivamente). Os danos histopatológicos foram leves, porém o grupo IN apresentou escores significativamente maiores em comparação ao grupo C ( $P<0,05$ ).

**Conclusões:** A utilização de hipotermia hepática tópica a 26°C associada ao PCI promoveu um efeito protetor sinérgico sobre a peroxidação lipídica hepática. Além disso, a indução de hipotermia tópica isoladamente ou em associação com o PCI atenuou os danos hepatocelulares e permitiu uma recuperação precoce da função hepática após a reperfusão, um mecanismo provavelmente relacionado a um efeito da hipotermia sobre o estresse oxidativo e preservação de ATP.

## Abstract

**Introduction:** The use of Topical Hypothermia or Ischemic Preconditioning (IPC) in hepatic resections can be useful to attenuate ischemia/reperfusion injuries. However, until the present moment, the combination of both techniques was not evaluated. **Objectives:** Development of an experimental model to assess the initial ischemia/reperfusion injuries and the possible synergistic effects when both tools are applied concomitantly. **Methods:** Ninety minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion were applied to rat livers. Animals were divided into five groups: Control (C), Normothermic Ischemia (NI), Ischemic Preconditioning (IPC), Hypothermia 26°C (H) and Hypothermia 26°C plus IPC (H+IPC). Mean arterial pressure (MAP), body temperature and bile flow were assessed every 15 minutes whereas ALT, AST, TBARS, SOD, CAT and histopathologic injuries were evaluated at the end of reperfusion. **Results:** No differences were seen in MAP and body temperature throughout the experiment. Bile flow returned to values similar to C group in the H and H+IPC groups after 45 minutes of reperfusion and was significantly higher in the H and H+IPC groups after 105 minutes ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) and 120 minutes ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) of reperfusion in comparison to the NI and IPC groups. Plasmatic levels of AST and ALT were significantly higher in the NI ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) and IPC ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) groups in comparison to the C group. TBARS levels were significantly higher in the NI ( $P<0.01$ ), IPC, and H ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) groups in comparison to the H+IPC group and higher in the NI group in comparison to the C group ( $P<0.05$ ). In the H group there was a negative correlation between ALT and AST to bile flow ( $P<0.05$ ) and positive correlation between AST and ALT to TBARS ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ). CAT levels were significantly higher in the PCI group in comparison to the C ( $P<0.01$ ), NI and H+IPC ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) groups whereas SOD levels were significantly higher in the H group in comparison to the C ( $P=0.01$ ), NI, PCI and H+IPC ( $P<0.05$ , respectively) groups. Histopathologic injuries were mild and the NI group showed a significantly greater score in comparison to the C group ( $P<0.05$ ). **Conclusions:** The induction of topical liver hypothermia at 26°C associated to IPC promoted a synergistic protective effect on hepatic lipid peroxidation. In addition, the induction of isolated topical hypothermia or hypothermia associated to IPC attenuated liver injuries and allowed an early recovery of the liver function after reperfusion, a mechanism probably related to an effect of hypothermia on oxidant stress and ATP preservation.

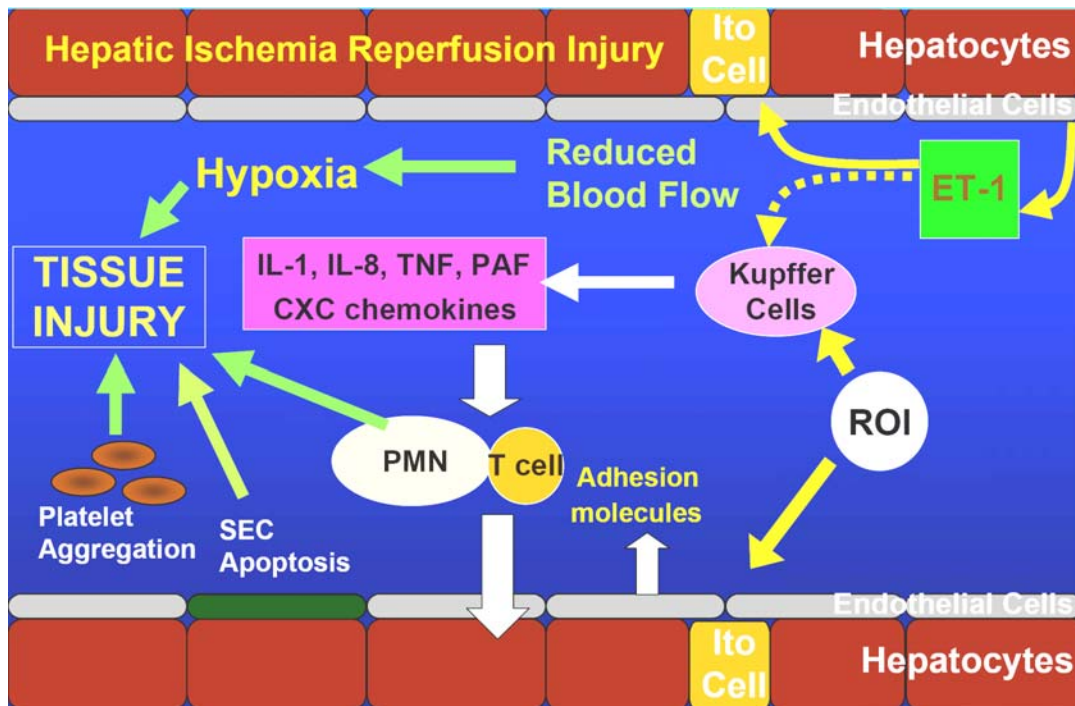


## 1. Introdução

### 1.1 Isquemia e Reperfusão Hepática, Pré-condicionamento Isquêmico e Hipotermia

Os danos hepáticos secundários ao processo de isquemia e reperfusão têm sido, ao longo das últimas décadas, alvo de intensas investigações. Seus efeitos têm sido implicados na patogênese de uma variedade de condições clínicas, tais como o trauma, os choques hipovolêmico e séptico, cirurgias vasculares, transplante de fígado e ressecções hepáticas (1). Sabe-se que as conseqüências da isquemia em diferentes tecidos dependem de sua duração, e que muitas das lesões se desenvolvem durante o estágio de reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual. Os mecanismos precisos que induzem aos danos não foram completamente elucidados, porém existe substancial evidência de que a geração de Radicais Livres de Oxigênio (RLO) e distúrbios na microcirculação hepática estão envolvidos nesta síndrome clínica (2).

No que diz respeito ao fígado, a disfunção microcirculatória ocorre por danos às células endoteliais e por um desequilíbrio entre moléculas vasoconstritoras e vasodilatadoras, tais como a Endotelina-1 (ET-1) e o Óxido Nítrico (ON). Este desarranjo provoca o fenômeno de Falha de Perfusão do Órgão (“*No reflow*”) após a reperfusão, efeito combinado da liberação de citocinas pró-inflamatórias, acúmulo de subprodutos tóxicos e agregação plaquetária, os quais provocam restrição mecânica ao fluxo sanguíneo. Simultaneamente, uma maior interação entre polimorfonucleares e endotélio ocorre com a participação de moléculas de adesão que facilitam a infiltração no parênquima hepático. Como conseqüência final, ocorrem danos às células e disfunção orgânica (3). Figura 1.



**Figura 1: Mecanismos relacionados aos danos de isquemia e reperfusão no fígado.**  
**Legenda:** ET-1 – Endotelina 1, IL-1 – Interleucina 1, IL-8 – Interleucina 8, TNF – de Necrose Tumoral, PAF – Fator Ativador Plaquetário, CXC chemokines – Quimioquinas CXC, ROI – Radicais Livres de Oxigênio, PMN – Polimorfonucleares, SEC – Células Endoteliais. Extraído de Wiesner RH, 2008.

Um considerável número de estudos experimentais têm indicado que as lesões promovidas pela isquemia e reperfusão no fígado ocorrem de um modo bifásico (4). Dados obtidos de diferentes grupos de pesquisadores sugerem que tanto na fase precoce como na tardia, o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos patogênicos. A fase precoce da reperfusão, compreendida entre 30 minutos e 4 horas, parece estar associada à liberação de RLO pelas células de Kupffer ativadas e à alteração na cadeia respiratória dos hepatócitos e do endotélio sinusoidal. As mitocôndrias são alvos importantes neste processo. Nestas organelas ocorre diminuição da atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH), da adenosina difosfato (ADP), da adenosina trifosfato (ATP) e da ATPsintetase. Paralelamente, ocorre um acentuado acúmulo de cálcio e geração de RLO. A associação destes eventos pode ser

responsável pelas lesões e morte celular decorrentes da reperfusão, possivelmente por um fenômeno de Permeabilidade Transitória da Membrana Mitocondrial Interna (5).

Na fase tardia da reperfusão, que ocorre entre 6 e 24 horas após a reoxigenação do órgão, desenvolve-se um processo inflamatório que tem a participação de diversos mediadores, os quais interagem a fim de provocar infiltração do parênquima hepático pelos neutrófilos ativados e também necrose e apoptose das células (6).

Algumas intervenções têm sido utilizadas a fim de atenuar os danos de isquemia e reperfusão no fígado, com pouca aceitação até o momento. No final dos anos oitenta, uma estratégia cirúrgica baseada em mecanismos endógenos foi descoberta e cunhada como Pré-condicionamento Isquêmico (PCI). O PCI consiste na aplicação de curtos períodos de isquemia separados por reperfusão intermitente. Esta intervenção torna o órgão resistente a períodos sustentados de isquemia através de uma série de diferentes mecanismos e mediadores (7). Outra estratégia reconhecidamente eficaz, mas pouco utilizada, é a indução de hipotermia. Sua aplicação ficou restrita pelo receio de eventos adversos graves relacionados à diminuição da temperatura corporal (8). Entretanto, novas técnicas têm permitido que esta ferramenta seja utilizada com segurança (9). Até o presente momento, os efeitos da combinação da Hipotermia com o PCI nunca foram testados no fígado, embora seus efeitos em outros órgãos já tenham sido avaliados (10, 11). A presente revisão engloba os principais estudos que avaliaram a Hipotermia e o PCI até então, destacando os possíveis mecanismos envolvidos na proteção do fígado contra os efeitos da isquemia e reperfusão.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Técnicas de Indução de Hipotermia em Cirurgia Hepática

Os primeiros relatos do uso de hipotermia em cirurgia hepática datam de 1953, quando Raffucci e colaboradores demonstraram, em animais, que a indução de Resfriamento Corporal Total aumentava a tolerância do fígado aos efeitos da interrupção do fluxo sanguíneo aferente. Desta forma, o período de tolerância à isquemia podia atingir até uma hora (12). Em 1961, Longmire e colaboradores realizaram a primeira hepatectomia direita bem sucedida utilizando hipotermia corporal a 32°C (13). Em 1971, Fortner e colaboradores relataram o uso de Perfusão Hipotérmica *in situ* em hepatectomias de grande porte, utilizando solução de Ringer a 4°C em 33 pacientes com tumores avançados (14).

Os principais métodos de aplicação de hipotermia são o Resfriamento Corporal Total e a Perfusão Hipotérmica *in situ* (15). Entretanto, o primeiro não tem sido aceito em virtude dos efeitos adversos sobre a macrohemodinâmica e o metabolismo sistêmico, já que pode provocar hipotensão, arritmias cardíacas e acidose metabólica. Já a Perfusão Hipotérmica *in situ* é tecnicamente difícil, exige Exclusão Vascular Total e muitas vezes *by-pass* da circulação portal. Em virtude disso, tem sido utilizada em situações restritas, onde existe envolvimento da veia cava inferior pelo tumor e se considera a possibilidade de reconstruções vasculares (16). Mais recentemente, as técnicas de hipotermia têm permitido a ressecção de tumores em pacientes que apresentam doença crônica através do uso de Hipotermia Hepática Tópica (17-19).

Hannoun e colaboradores relataram, em 1996, uma série de 12 hepatectomias realizadas sob Exclusão Vascular Total e Perfusão Hipotérmica *in situ*, com uma média de clampeamento de 121 minutos. A taxa de complicações no pós-operatório foi alta e um indivíduo morreu por trombose portal. Segundo estes autores, devido à alta complexidade técnica, este método deveria

ser utilizado apenas em ressecções extensas, nas quais se antecipa um tempo de clampeamento hepático superior a 1 hora (20). Mais recentemente, em uma análise clínica retrospectiva, a Perfusão Hipotérmica *in situ* foi avaliada em ressecções hepáticas com duração maior ou menor que 60 minutos. Azoulay e colaboradores constataram que, independente do tempo de isquemia, a Perfusão Hipotérmica *in situ* esteve associada a uma maior tolerância do fígado à isquemia, traduzida por uma significativa redução na atividade das transaminases no pós-operatório. Ainda, nas ressecções com duração maior que 60 minutos, a função hepática, a função renal e o número de complicações foram significativamente menores no grupo com hipotermia. Os autores reforçaram o fato que as ressecções com Perfusão Hipotérmica *in situ* foram mais complexas, necessitando com maior frequência de reconstruções vasculares e tendo, em sua maioria, duração maior que 90 minutos. Mesmo com estas características desfavoráveis, a Perfusão Hipotérmica *in situ* obteve melhores resultados (21).

A Hipotermia Hepática Tópica, técnica na qual se utilizam soluções semicongeladas sobre o fígado, é um método mais simples, que pode ser utilizado em pacientes com hepatopatia crônica. A técnica pode ser aplicada tanto com Exclusão Vascular Total e *by-pass* portal, quanto com interrupção da perfusão para um hemifígado. O resfriamento tópico tem sido utilizado em segmentectomias direitas para pacientes com Carcinoma Hepatocelular e hepatopatias crônicas, reduzindo-se a temperatura do fígado a níveis entre 20°C e 25°C, o que permite prolongar o tempo de isquemia do fígado cirrótico em até 90 minutos, com redução da perda sangüínea no trans-operatório, recuperação satisfatória da função hepática e taxas de complicações semelhantes aos seus controles. Esta técnica, baseada em evidências experimentais e clínicas, tem as vantagens de ser menos invasiva, mais rápida e com custos mais baixos, podendo ser associada a qualquer ressecção que aplique interrupção do fluxo sangüíneo para o fígado (9). Em um estudo experimental com cães, a comparação entre o uso da Hipotermia Hepática Tópica e da Perfusão

Hipotérmica *in situ* durante 60 minutos de isquemia não demonstrou diferenças significativas na proteção conferida pelas duas técnicas (22). Imakita e colaboradores demonstraram os efeitos positivos do resfriamento tópico em um estudo com cães submetidos a um período de isquemia de 60 minutos em 70% da massa hepática. Os autores isolaram o fígado na cavidade abdominal, resfriando o órgão através da deposição local de uma solução semicongelada até o órgão atingir temperaturas médias de  $23 \pm 4.9$  °C, enquanto a temperatura retal foi conservada entre  $35 \pm 0.6$  °C durante todo o experimento. O resfriamento tópico não provocou efeitos adversos sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e a frequência cardíaca. Após 6 horas de reperfusão, as atividades das transaminases hepáticas séricas foram significativamente menores no grupo hipotérmico, o mesmo ocorrendo em relação à transaminase glutâmico oxalacética mitocondrial após 3, 6 e 24 horas. A depuração do verde de indocianina demonstrou recuperação da função no grupo hipotérmico. Ainda, as concentrações citoplasmáticas e mitocondriais do  $Ca^{++}$  foram significativamente menores no grupo hipotérmico em 5 minutos e 3 horas. Os autores complementaram o estudo com a realização de bisegmentectomias em pacientes com doença hepática crônica. Novamente não foram constatadas alterações hemodinâmicas e metabólicas com a aplicação de Hipotermia Hepática. A análise dos marcadores de lesão e função foi semelhante nos grupos hipotérmico e normotérmico, porém os casos considerados mais complicados foram direcionados para o grupo com hipotermia, que apresentou tempos de clampeamento significativamente maiores que o grupo normotérmico, prejudicando a análise global. Os autores concluíram que as ressecções em que se antecipa a possibilidade de tempos de isquemia elevados podem se beneficiar do uso de Hipotermia Hepática Tópica (15).

## **2.2 Hipotermia Hepática: Mecanismos de Ação e Estresse Oxidativo**

O princípio pelo qual a hipotermia exerce seus efeitos está no fato que existe uma redução do metabolismo enzimático de 1,5 a 2 vezes a cada redução de 10°C na temperatura tecidual (23). Devido à queda nas taxas metabólicas promovida pela hipotermia, o uso desta ferramenta tem sido considerado um método efetivo de proteção dos órgãos sujeitos à hipóxia. Sob hipotermia, tanto a oferta de oxigênio quanto a demanda pelos tecidos estão reduzidas (24).

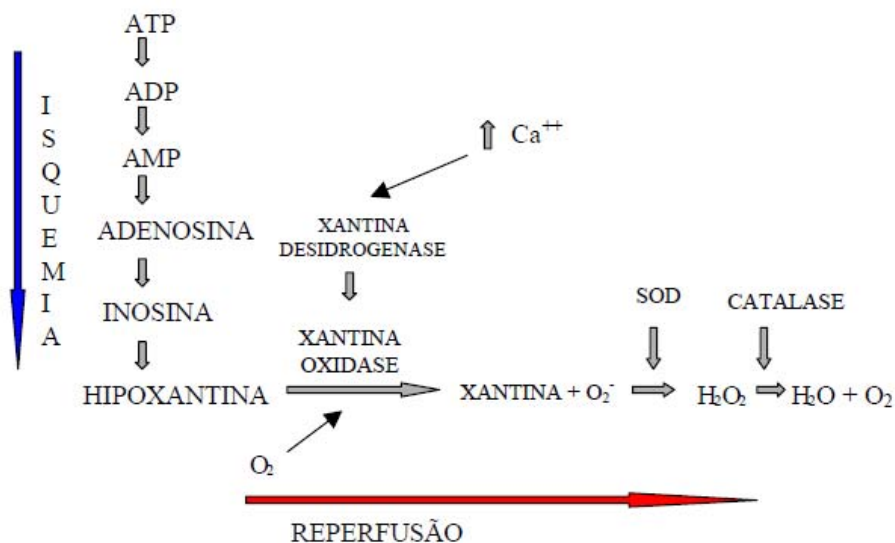
Takahashi e colaboradores utilizaram um modelo de Hipotermia Corporal Total em que os animais foram mantidos em normotermia ou hipotermia entre 30°C e 32°C e a fração de oxigênio inspirado foi reduzida progressivamente a cada 20 minutos. O experimento iniciou com uma fração de oxigênio inspirado de 50%, reduzida até alcançar uma fração de 10%. Nestas condições, os autores demonstraram que a degradação de ATP foi significativamente menor no grupo hipotérmico, indicando que a função celular durante a hipóxia foi protegida pela hipotermia moderada. A ressuscitação por inalação de oxigênio a 100% restaurou quase que completamente o estado fosfoenergético no grupo hipotérmico, mas não no grupo normotérmico, demonstrando claramente os efeitos protetores da hipotermia moderada sobre o metabolismo energético em ratos contra uma hipóxia gradual (25).

Embora a hipotermia a 4°C seja considerada danosa para alguns tipos de células, tais como os hepatócitos e as células endoteliais, existem evidências crescentes de que uma proteção efetiva dos tecidos pode ser alcançada com uma hipotermia leve a moderada. Entretanto, até o momento não existe uma investigação sistemática que determine qual o nível de temperatura ótimo para a proteção do fígado. Alguns autores têm demonstrado que os efeitos protetores contra os danos de isquemia e reperfusão são evidentes quando se atinge uma temperatura de 26°C no fígado de ratos, sendo que reduções adicionais na temperatura não oferecem proteção adicional

(26). Outros autores, em estudos experimentais, relataram que a temperatura de 28°C em situação de Exclusão Vascular Total seria um nível suficiente para diminuir as lesões hepáticas associadas à isquemia normotérmica, e uma temperatura de 34°C seria suficiente para inibir a resposta inflamatória relacionada à isquemia e reperfusão (8, 27).

Khandoga e colaboradores investigaram os efeitos da temperatura intra-hepática sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos a 90 minutos de isquemia do lobo esquerdo do fígado, em temperaturas de 4°C, 15°C, 26°C, 34°C e 37°C, obtida através do gotejamento de Ringer Lactato gelado ou aquecido sobre o fígado isquêmico, que permanecia isolado na cavidade abdominal com o auxílio de um dispositivo de polietileno semelhante a uma concha. Os resultados demonstraram que os parâmetros hemodinâmicos medidos pela PAM foram semelhantes em todos os grupos, bem como as temperaturas corporais dos animais, as quais foram mantidas entre 36°C e 37°C artificialmente. No tecido hepático, as concentrações de metabólitos do ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são marcadores de peroxidação lipídica de membranas celulares promovidas pela ação dos RLO, apresentaram redução significativa nos grupos 34°C e 26°C após 5 e 30 minutos de reperfusão, sendo praticamente indetectáveis nos grupos 15°C e 4°C, sugerindo uma forte participação do estresse oxidativo tecidual. As concentrações totais de adenina nucleotídeos no tecido hepático foram significativamente menores nos grupos 26°C e 32°C em comparação com o grupo 4°C e 15°C, redução esta relacionada à degradação de ATP e ADP. A 37°C houve intensa hidrólise de AMP. Os autores concluíram que o estresse oxidativo nos tecidos hepáticos é fortemente dependente da temperatura do órgão, obedecendo a um padrão não-linear, e que a hipotermia leve reduz a produção intracelular de RLO devido à prevenção da degradação do AMP em hipoxantina (28).





**Figura 2: Mecanismo de produção de RLO pela ação da Xantina Oxidase.**

Em um experimento de Perfusão Hepática *in situ*, Zar e colaboradores aplicaram um modelo de 150 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão, mantendo os animais a 34°C ou 38°C durante a isquemia. Um terceiro grupo, com isquemia normotérmica e reperfusão hipotérmica a 34°C, também foi avaliado. Os autores monitoraram o efeito da temperatura sobre a formação de RLO e desenvolvimento do fenômeno “*No reflow*”, e os resultados demonstraram que a hipotermia leve, tanto durante a isquemia quanto na reperfusão, reduziu a formação de RLO, a peroxidação lipídica de membranas e a resistência vascular hepática, quando comparada ao grupo normotérmico. Os achados levaram os autores a concluir que a hipotermia leve foi capaz de reduzir a produção de RLO de forma suficiente para evitar a ocorrência de lesões celulares, bem como a falha de perfusão (29). De forma semelhante, outros autores relataram os efeitos protetores do uso da hipotermia em porcos, utilizando um modelo de hepatectomia esquerda associada à Exclusão Vascular Total e Perfusão Hipotérmica *in situ* do lobo direito com uma solução resfriada de Ringer-glicose, até atingir uma redução de 10°C na temperatura do lobo

hepático remanescente durante a ressecção do lobo esquerdo. O período de clampeamento foi de 120 minutos, seguido por 24 horas de reperfusão. Os animais com Perfusão Hipotérmica *in situ*, em contraste com os controles e normotérmicos, apresentaram um quadro de estabilidade hemodinâmica durante todo o experimento, enquanto os outros grupos necessitaram de suporte inotrópico para tolerar a Exclusão Vascular Total. A mortalidade foi significativa nos grupos normotérmicos, enquanto todos os animais sobreviveram no grupo hipotérmico. A atividade da AST foi significativamente menor no grupo hipotérmico em relação ao grupo normotérmico e também aos controles. A análise da função hepática através da produção de bile demonstrou recuperação a níveis pré-isquêmicos no grupo hipotérmico, enquanto esta recuperação não foi observada no grupo normotérmico. A atividade inflamatória, avaliada pela expressão da IL-6, demonstrou que no grupo hipotérmico esta interleucina estava significativamente diminuída até 6 horas após a reperfusão, enquanto em 12 e 24 horas a atividade não foi significativa. Ainda, a atividade do ácido hialurônico, marcador de função do endotélio, demonstrou que a hipotermia local não interferiu na função endotelial. Os autores concluíram que uma redução de 10°C na temperatura hepática no modelo proposto foi protetora contra os danos de isquemia e reperfusão (30).

Sob Exclusão Vascular Total e Perfusão Hipotérmica *in situ* por 60 minutos, Dinant e colaboradores estudaram os efeitos da aplicação de hipotermia a 20°C e 28°C com uma perfusão de solução de Ringer a 4°C. Os valores da PAM, frequência cardíaca e temperatura corporal não foram alterados pela aplicação de hipotermia, quando comparados a um grupo em normotermia durante o experimento. Entretanto, a atividade da AST foi significativamente reduzida nos grupos hipotérmicos, o mesmo acontecendo com a produção de bile, que foi significativamente maior nos grupos hipotérmicos após 24 horas de reperfusão, em comparação ao grupo normotérmico. Este último achado foi corroborado por taxas maiores de depuração do verde de indocianina após

6 horas de reperfusão nos grupos hipotérmicos, e pela depuração do ácido hialurônico após 24 horas de reperfusão. As taxas de IL-6 plasmáticas, após a reperfusão, encontravam-se significativamente reduzidas no grupo 20°C. Ainda, os escores de danos histopatológicos, os quais avaliaram a necrose hepatocelular, a presença de vacuolização e infiltrados neutrofilicos demonstraram um aumento significativo no grupo normotérmico, às custas do aumento de vacuolização, enquanto a presença de necrose foi mínima em todos os grupos e os infiltrados neutrofilicos não demonstraram diferença significativa entre os grupos. Os autores ressaltaram que no grupo normotérmico houve uma intensa congestão nos primeiros 40 minutos de reperfusão, e que esta falha de perfusão resultou em instabilidade hemodinâmica, choque e subsequente óbito em 33% dos animais, efeitos atribuídos à vacuolização celular e estase leucocitária, enquanto estes achados não foram observados nos grupos com hipotermia. Os autores concluíram que a hipotermia a 28°C foi tão eficiente quanto a hipotermia a 20°C em preservar as células endoteliais e a função hepatocitária, além de prevenir a falha de perfusão microvascular (8).

Os efeitos da hipotermia corporal em ratos obesos foram estudados por Niemann e colaboradores. Estes autores utilizaram um modelo de isquemia de 75 minutos e 8 horas de reperfusão nos lobos mediano e lateral esquerdo, dividindo os animais em um grupo em normotermia e outro em que a temperatura foi mantida artificialmente em 33°C. A análise histopatológica demonstrou importante congestão sinusoidal e alterações difusas compatíveis com necrose precoce dos hepatócitos, como cariorexis e picnose nuclear, além da necrose citoplasmática, atingindo taxas médias de 75% de necrose do parênquima. Já os animais hipotérmicos apresentaram congestão sinusoidal menos pronunciada e taxas de necrose médias de 25%. Os achados foram consistentes com a redução da atividade da ALT, do lactato e aumento

da glicose e da Betaína, este último um marcador de regulação do volume celular, demonstrando claramente os efeitos protetores da hipotermia (31).

O nível de hipotermia de 34°C foi estudado em ratos obesos por Choi e colaboradores. Estes autores utilizaram um protocolo de 75 minutos de isquemia nos lobos mediano e lateral esquerdo, em fígados com e sem esteatose, seguidos por reperfusão de 24 horas. Os achados demonstraram que os grupos com e sem esteatose submetidos a hipotermia apresentaram níveis de transaminases hepáticas significativamente menores que os grupos normotérmicos. Além disso, a mortalidade no grupo normotérmico de ratos obesos foi significativamente maior que nos outros grupos, bem como as taxas de necrose na análise histopatológica, ao redor de 75% do parênquima. Nos ratos hipotérmicos as taxas de apoptose foram semelhantes para ratos obesos e normais, enquanto nos grupos normotérmicos a avaliação do grau de apoptose ficou prejudicada em virtude da grande quantidade de necrose presente no parênquima (32).

Já em um estudo que avaliou o efeito da hipotermia leve (33-34°C) em situação de choque hemorrágico de 90 minutos e 3 horas de reperfusão, os autores constataram que, embora a hipotermia estivesse associada a uma diminuição nas lesões hepáticas, a peroxidação lipídica das membranas foi semelhante ao grupo normotérmico, o que levou os autores a concluir que o estresse oxidativo não é um mecanismo fundamental para evitar as lesões que ocorrem durante o choque hemorrágico (33).

### **2.3 Hipotermia Hepática: Resposta Inflamatória**

A resposta inflamatória relacionada à isquemia e reperfusão do fígado é caracterizada por uma produção precoce das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as quais são liberadas pelas células de Kupffer imediatamente após a reperfusão (34). Estas citocinas propagam a resposta inflamatória

através de uma regulação de moléculas de adesão sobre o endotélio vascular hepático e aumentam a produção de quimioquinas CXC (35). A interação entre moléculas de adesão e quimioquinas CXC resulta no recrutamento de neutrófilos do espaço vascular para o parênquima. Os neutrófilos ativados causam danos hepatocelulares por obstrução da microcirculação, liberação de proteases e RLO (36). Em modelos experimentais, o bloqueio de mediadores inflamatórios tem demonstrado benefícios na redução dos danos hepáticos relacionados ao processo de isquemia e reperfusão (35, 37), o que tem levado a considerar seu uso como terapia para reduzir a morbidade das ressecções hepáticas.

As alterações na microcirculação que ocorrem em situação de isquemia hipotérmica foram estudadas por Biberthaler e colaboradores. Estes autores realizaram um experimento em camundongos utilizando um modelo de isquemia parcial do fígado durante 90 minutos e Hipotermia Hepática Tópica a temperaturas de 37°C, 26°C, 15°C e 4°C, e avaliaram a microcirculação hepática por Microscopia Intravital em 30, 120 e 240 minutos após a reperfusão. As interações entre leucócitos e endotélio foram quantificadas pelo número de leucócitos que estavam firmemente aderidos ao endotélio nas veias pós-sinusoidais. Os achados demonstraram que o Índice de Perfusão Sinusoidal e o número de leucócitos aderentes (aumento de 40 vezes) foi significativamente maior no grupo normotérmico em comparação ao grupo controle em todos os tempos avaliados, enquanto que os grupos com hipotermia não demonstraram diferença em relação aos controles. Os achados foram corroborados por níveis de transaminases significativamente elevados no grupo normotérmico em relação aos grupos com hipotermia. Na análise da microscopia eletrônica, os grupos com hipotermia apresentaram arquitetura normal, enquanto no grupo normotérmico surgiram edema mitocondrial, vacuolização e desintegração celular. Os autores descartaram a influência de fatores macrohemodinâmicos, já que a avaliação da PAM não demonstrou alterações durante todo o curso do experimento e concluíram que uma

redução da temperatura ao nível de 26°C já determina efeitos positivos sobre a microcirculação hepática, sem necessidade de redução adicional na temperatura (38).

Em um experimento onde se utilizou resfriamento corporal em ratos, os autores dividiram os animais em um grupo controle, um normotérmico a 37°C, um com hipotermia leve a 34°C e outro com hipotermia moderada a 31°C. Foram aplicados 45 minutos de isquemia nos lobos mediano e lateral esquerdo, os quais representam 70% da massa hepática, seguidos por 24 horas de reperfusão. A avaliação das transaminases hepáticas demonstrou redução significativa nos grupos hipotérmicos, que foram semelhantes aos controles. Os escores histopatológicos demonstraram necrose grave no grupo normotérmico, necrose leve no grupo 34°C e ausência de necrose no grupo 31°C. A atividade da MPO, marcador de infiltração neutrofílica, foi encontrada no grupo 37°C, estando ausente nos grupos hipotérmicos. As concentrações sanguíneas da Betaína, marcador osmótico de lesão hepática das células de Kupffer, células de Ito e endotélio, estavam significativamente elevadas no grupo 37 °C, bem como as concentrações de acetato, hidroxibutirato, alanina, triptofano e fenilacetato quando comparadas com os outros grupos, demonstrando claramente uma redução no catabolismo de aminoácidos pelo fígado, acúmulo de subprodutos do metabolismo anaeróbico e diminuição da função hepática em isquemia normotérmica. A peroxidação lipídica após 24 horas, entretanto, foi semelhante em todos os grupos, fato atribuído à coleta após 24 horas, quando a participação do estresse oxidativo é menor. Os autores ressaltaram que não existiram diferenças entre os grupos hipotérmicos e que a temperatura de 34°C foi suficiente para obter-se proteção do fígado, sem efeitos adicionais com o uso de hipotermia a 31°C. A proteção, segundo os autores, poderia ser atribuída a uma inibição no recrutamento de neutrófilos no parênquima hepático, com pequena participação do metabolismo energético. Os autores enfatizaram a necessidade de um controle rígido da temperatura quando se realizam experimentos que envolvem isquemia e reperfusão, uma vez que

níveis surpreendentemente baixos de transaminases são relatados com frequência, o que sugere que estes experimentos possam ter sido realizados em condições de hipotermia (27).

Kato e colaboradores estudaram os mecanismos de proteção conferida pela hipotermia sobre a resposta inflamatória na isquemia e reperfusão hepática em camundongos. Utilizando um modelo de isquemia de 90 minutos em 70% do parênquima hepático, os animais foram divididos em um grupo com temperatura artificialmente mantida entre  $33.8 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  e  $36.7 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$  durante o início e término da isquemia, respectivamente, e um outro grupo sem que a temperatura fosse controlada, onde a temperatura variou durante a isquemia entre  $30.6 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$  e  $25.9 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  no início e término do clampeamento do pedículo hepático, respectivamente. Na reperfusão, o grupo que manteve as temperaturas artificialmente controladas apresentou uma variação de temperatura entre  $35^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$  nas 4 horas seguintes, enquanto o grupo sem controle de temperatura se manteve hipotérmico por mais 4 horas, quando a temperatura espontaneamente passou a elevar-se até  $35^{\circ}\text{C}$ . A perfusão hepática avaliada pelo uso de azul de Evans nas fases iniciais de reperfusão foi semelhante em ambos os grupos em 1, 5, 10, 20 e 30 minutos, ressaltando os autores, porém, que o aspecto macroscópico dos fígados hipotérmicos foi mais uniforme imediatamente após a reperfusão. Após 8 horas de reperfusão, os níveis da ALT estavam significativamente diminuídos no grupo hipotérmico em comparação ao grupo normotérmico, uma redução de 89%. A avaliação da razão de peso seco versus peso normal de massa hepática mostrou que os ratos hipotérmicos apresentaram uma redução de 91% no edema celular quando comparados aos ratos normotérmicos. Os achados histopatológicos foram consistentes com a ocorrência de danos sinusoidais compatíveis com o fenômeno de “*No reflow*” no grupo normotérmico, que apresentou numerosas áreas de necrose e infiltrados neutrofílicos, achados que não foram encontrados no grupo hipotérmico, o qual manteve sua arquitetura preservada. Ainda, os níveis de MPO tecidual foram completamente abolidos no grupo hipotérmico, enquanto o aumento da

MPO foi significativo no grupo normotérmico. As atividades do TNF- $\alpha$ , da IL-1 $\beta$  também estavam significativamente diminuídas no grupo hipotérmico. Curiosamente, nenhuma diferença foi encontrada nos grupos em relação ao NF- $\kappa$ B, que regula muitas destas citocinas, enquanto a proteína ativadora 1 (AP-1) estava com sua atividade reduzida no grupo hipotérmico. Os achados dos autores demonstraram uma nova explicação para os efeitos benéficos da hipotermia, não ligada à economia energética (39). De fato, outros autores já haviam assinalado que os efeitos protetores sobre as células hepáticas surgem mesmo com pequenas reduções nas temperaturas, e que somente uma modesta redução no metabolismo e no consumo de oxigênio não poderiam explicar completamente a profunda proteção evocada por uma hipotermia somente moderada (27).

Este mesmo grupo de pesquisadores utilizou um modelo semelhante de isquemia de 90 minutos e regulou artificialmente a temperatura corporal dos animais durante o período de isquemia entre 35-37°C, 33-35°C, 29-33°C e utilizou um grupo sem controle de temperatura, a qual caiu espontaneamente abaixo de 29°C. As aferições foram realizadas em intervalos de 15 minutos e a temperatura foi mantida entre 35-37°C após a reperfusão, que durou 8 horas. As lesões hepatocelulares, avaliadas pela ALT, foram inversamente proporcionais à temperatura dos animais, achados que foram consistentes com a análise histopatológica, a qual mostrou diversas áreas de necrose e intensos infiltrados nos grupos 35-37°C e 33-35°C, enquanto que no grupo 29-33°C havia menores áreas de necrose e poucos infiltrados neutrofilicos. O grupo cuja temperatura permaneceu abaixo de 29°C apresentou histologia normal. Após 8 horas de reperfusão, os níveis de MPO dos grupos 29-33°C e <29°C foram significativamente menores que os dos outros grupos. A atividade da NF- $\kappa$ B após 1 hora de reperfusão estava aumentada em todos os grupos, mas foi significativamente maior nos grupos 29-33°C e <29°C. Após 4 e 8 horas de reperfusão, a ativação do NF- $\kappa$ B nos grupos 29-33°C e <29°C foi significativamente maior que nos outros



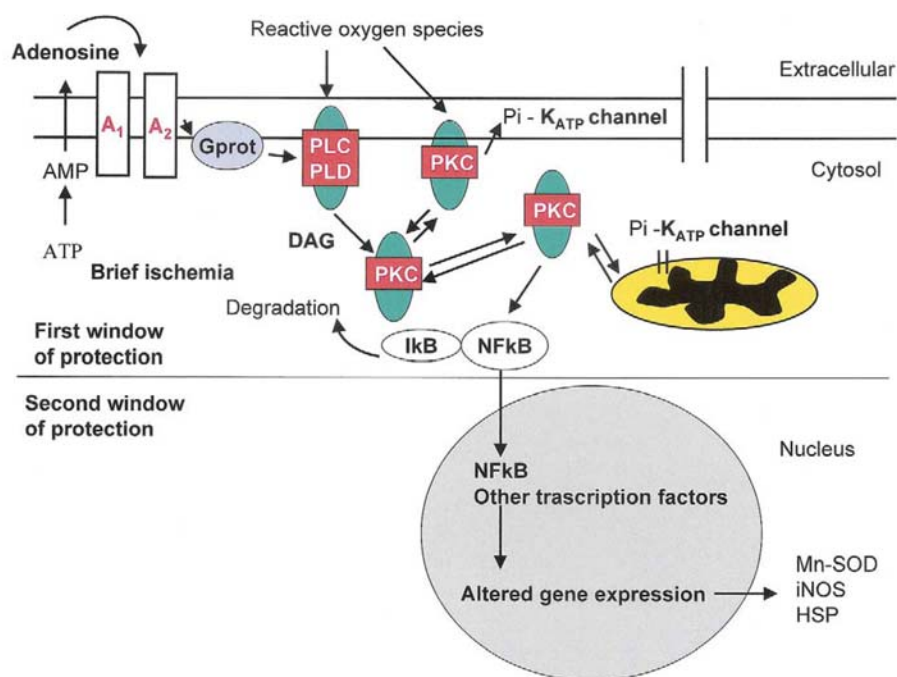
grupos, que foram semelhantes aos controles. Os dados demonstraram que o efeito protetor da hipotermia durante o período isquêmico estava associado a uma ativação seletiva do NF- $\kappa$ B dos hepatócitos nos grupos com temperaturas mais baixas, enquanto os grupos com temperaturas mais próximas do normal apresentaram uma menor ativação (40). Embora estudos tenham postulado que a inibição do NF- $\kappa$ B suprime a resposta inflamatória e limita os danos celulares, dados de outros modelos demonstram que a ativação do NF- $\kappa$ B hepatocitário é citoprotetora (41-43).

Os efeitos da hipotermia tópica sobre a resposta inflamatória sistêmica e os danos em órgãos-alvo, como os pulmões, foram avaliados por Patel e colaboradores. Utilizando um modelo de isquemia de 90 minutos e hipotermia tópica de 25°C, a atividade do TNF- $\alpha$  foi avaliada em 15, 30, 60 e 720 minutos. Os resultados demonstraram que o TNF- $\alpha$  se encontrava significativamente elevado no grupo normotérmico nos tempos 15 e 30 minutos. Os escores de necrose hepatocelular e de infiltrados neutrofílicos foram significativamente menores no grupo hipotérmico após 20 horas de reperfusão. A avaliação do tecido pulmonar após os mesmos períodos de reperfusão demonstrou uma redução significativa na permeabilidade vascular pulmonar e nos níveis de MPO. Os autores atribuíram os efeitos positivos da hipotermia a uma diminuição na atividade metabólica das células de Kupffer com a redução da temperatura, provocando uma redução na liberação de TNF- $\alpha$  por estas células na reperfusão, o que reduziria, por sua vez, a resposta inflamatória sistêmica e os danos locais e em órgãos distantes, como o pulmão (44).

## 2.4 Pré-condicionamento Isquêmico: Mecanismos de Ação

O efeito protetor do PCI foi relatado pela primeira vez no miocárdio por Murry, em 1986. Este fenômeno consiste na aplicação de breves períodos de isquemia, separados por reperfusão intermitente, o que torna os órgãos resistentes ao processo de isquemia e reperfusão por tempos mais prolongados. Após este relato, o PCI foi alvo de intensas investigações, e a sua utilidade foi demonstrada em outros órgãos, como o intestino, músculo estriado, rins, pulmões, cérebro e fígado (45).

As bases moleculares consistem de uma série de eventos ordenados. Em resposta aos eventos que disparam o PCI, um sinal deve ser rapidamente gerado, o qual é traduzido em uma mensagem intracelular e amplificado a fim de influenciar o mecanismo efetor de proteção. Embora diversas substâncias tenham sido consideradas potenciais mediadores, a Adenosina é a substância que tem sido considerada o principal gatilho que dispara o PCI. A Adenosina é um subproduto do ATP que é liberado em grandes quantidades no espaço extracelular segundos após o início da isquemia. Ela exerce seus efeitos fisiológicos através da interação com quatro tipos de receptores designados  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  e  $A_3$ . Os receptores  $A_2$  têm sido fortemente implicados no PCI do fígado. Embora incerta, a Adenosina tem demonstrado propriedades que inibem o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e adesão às células endoteliais, aumentam a estabilidade de membranas e a produção de energia pela facilitação do transporte de glicose e redução do influxo de  $Ca^{++}$  através da ativação de canais de  $K^+$  dependentes de ATP. Contudo, os efeitos bioquímicos da Adenosina que conferem proteção permanecem indefinidos (46-50). Figura 3.



**Figura 3: Bases moleculares do PCI. Diagrama representando os mecanismos responsáveis pela indução de proteção.**

**Legenda:** Adenosine – Adenosina, ET – Endotelina, IL-1- Interleucina 1, HSP- Proteínas de Choque Térmico, iNOS- Óxido Nítrico Sintetase Induzível, IκB- Inibidor do kappa B, Pi-K ATP channel – Canal de potássio ATP sensível, Mn-SOD – Manganês Superóxido Dismutase, DAG- Diacilglicerol, NF-κB – Fator Nuclear kappa B, PLC – Fosfolipase C, PLD – Fosfolipase D, PKC – Proteína Kinase C. Extraído de Cutrín e colaboradores, 2002.

Embora diversos protocolos de PCI tenham sido testados no fígado (51), a utilização de dez minutos de isquemia, seguidos por dez minutos de reperfusão fornece o maior nível de proteção antes de um período de isquemia prolongado (48). Classicamente foi descrito que o PCI oferece uma proteção inicial nas primeiras 3 horas de reperfusão e outra tardia em 12 a 24 horas, a qual persiste por 2 a 3 dias. Contudo, a janela de proteção tardia não está completamente definida (52).

**Tabela 1: Mecanismos de proteção contra a lesão de isquemia e reperfusão induzidos pelo Pré-condicionamento Isquêmico.**

---

Durante a fase de isquemia

1. Limitação da passagem de íons através das membranas plasmáticas e mitocondriais
2. Redução do metabolismo celular
3. Redução do consumo de ATP
4. Menor utilização da via da glicólise
5. Maior eficiência na transferência de energia intracelular
6. Diminuição da produção de H<sup>+</sup>
7. Manutenção do equilíbrio iônico após períodos prolongados de hipóxia
8. Transformação para um fenótipo tolerante à hipóxia

Após a reperfusão

1. Redução da produção de RLO
  2. Manutenção do potencial redox intracelular
  3. Redução da apoptose
  4. Preservação da integridade mitocondrial
  5. Atenuação da atividade leucocitária
  6. Redução da produção de citocinas
- 

Modificado de Pasupathy et al, 2005.

## **2.5. Efeitos do PCI sobre o Estresse Oxidativo**

Existem muitos relatos sobre o papel dos RLO na patogênese dos danos de IR. Os RLO são gerados precocemente na reperfusão e são capazes de interagir com um variado número de biomoléculas, as quais produzem peroxidação lipídica de membranas celulares, aumento da sua permeabilidade e, finalmente, morte celular devido a desarranjos microvasculares (53). As mitocôndrias são a principal fonte de RLO intracelulares, bem como a principal organela afetada por eles. Tanto a reperfusão de tecidos isquêmicos quanto a ação oxidativa têm sido implicadas em modificações estruturais e funcionais sobre as mitocôndrias, provocando uma sobrecarga de cálcio dentro da organela, a qual ativa fosfolipases que acabam por facilitar a abertura dos poros

de permeabilidade transitória. A consequência final é a perda da integridade mitocondrial (54). Alguns estudos demonstraram que o PCI é capaz de preservar a estrutura mitocondrial e inibir a apoptose, bem como preservar o estado redox da organela (55-57).

O dano oxidativo mitocondrial no fígado foi avaliado por Lee e colaboradores, que utilizaram um modelo de isquemia de 90 minutos e 5 horas de reperfusão em ratos, utilizando um PCI de 10 minutos previamente ao insulto isquêmico prolongado. Os autores observaram uma diminuição significativa da atividade da Glutamato Desidrogenase, marcador de dano à integridade mitocondrial, menor atividade das transaminases e menor ocorrência de necrose celular no grupo PCI. Além disso, houve redução dos níveis de  $H_2O_2$  no tecido hepático na reperfusão inicial, menor atividade da malondialdeído (MDA) mitocondrial, maiores níveis de GSH mitocondrial, redução do índice de estresse oxidativo (GSH/GSSG), prevenção da abertura dos poros mitocondriais e diminuição do volume mitocondrial. Foram encontradas também maiores concentrações de adenina nucleotídeos ao término da reperfusão. O grupo PCI apresentou níveis menores de Xantina e maiores concentrações de Adenosina. Neste estudo, os autores também observaram um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  durante os 10 minutos da aplicação do PCI, status que se normalizou nos 10 minutos de reperfusão seguintes. Após 90 minutos de isquemia, os níveis de  $H_2O_2$  atingiram um pico 10 minutos após a reperfusão no grupo submetido somente à isquemia. Este aumento foi suprimido pelo PCI. Os achados reforçaram a hipótese de que os RLO são fundamentais durante a aplicação do PCI e que um estresse oxidativo subletal durante o PCI dispara mecanismos protetores, que resultam em uma maior tolerância do fígado durante a reperfusão inicial. Os autores concluíram que o PCI protege o fígado dos danos provocados pela isquemia e reperfusão, atenuando os danos às mitocôndrias produzido pelo estresse oxidativo (58). Os achados deste estudo foram semelhantes aos que haviam sido relatados previamente por outros autores. Rüdiger e colaboradores utilizaram N-acetilcisteína

(NAC) durante o período do PCI e observaram que a abolição do estresse oxidativo, na fase de isquemia inicial, revertia os efeitos protetores do PCI em animais sujeitos a 75 minutos de isquemia e 3 horas de reperfusão. Os danos hepatocelulares e a apoptose foram significativamente maiores no grupo que utilizou NAC mais o PCI. De forma semelhante, a administração de precursores do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes do período de isquemia simulava os efeitos do PCI. Todos os animais pré-condicionados sobreviveram por sete dias, enquanto que no grupo NAC a mortalidade foi elevada (59).

Outros autores investigaram os efeitos do PCI sobre o sistema antioxidante e relataram efeitos positivos. Em um modelo de isquemia de 70% do fígado durante 90 minutos e 3 horas de reperfusão, associado a um grupo com um PCI de 10 minutos, Yuan e colaboradores relataram que o PCI provocava aumento significativo das concentrações no tecido hepático da superóxido dismutase (SOD), marcador da liberação do radical livre superóxido, da Catalase (CAT), marcador da liberação de peróxido de hidrogênio e da Glutathione peroxidase (GPx), importante marcador dos danos oxidativos. Estas enzimas fazem parte do principal sistema de defesa antioxidante hepático contra a ação dos RLO. Os autores concluíram que o PCI confere proteção ao fígado por uma melhora na atividade enzimática dos antioxidantes endógenos (60). Os mecanismos pelos quais esta estimulação ocorre poderiam estar relacionados direta ou indiretamente a fatores de transcrição, tais como o NF-κB e AP-1, conforme previamente demonstrado (61, 62). Um outro efeito positivo foi observado sobre os níveis de MDA hepático, marcador de peroxidação lipídica, os quais foram significativamente menores nos grupos PCI, demonstrando que a ação dos RLO sobre as membranas foi atenuada com a aplicação do PCI (58, 60).

A hipótese de um efeito sinérgico utilizando drogas hepatoprotetoras associadas ao PCI parecia promissora. Desta forma, a capacidade de proteção do PCI em associação com alopurinol

foi estudada por Lee e colaboradores. Os autores demonstraram que a atividade da MDA mitocondrial encontrava-se reduzida nos grupos PCI e alopurinol e ainda mais reduzida com a associação de ambos. O uso do PCI mais alopurinol permitiu uma atenuação no consumo de GSH ao término das 5 horas de reperfusão e os níveis de  $H_2O_2$  no tecido hepático também sofreram diminuição significativa em comparação aos outros grupos. Os autores concluíram que a combinação do PCI e alopurinol possui efeito sinérgico ao impedir o estresse oxidativo no tecido hepático (63).

## **2.6 Efeitos do PCI sobre o Metabolismo Energético**

Estudos têm demonstrado que o PCI pode induzir mecanismos poupadores de energia, os quais diminuem a degradação de ATP e o acúmulo de lactato durante o período isquêmico (64). Lee e colaboradores observaram que as concentrações de ATP ao término da reperfusão em fígados isquêmicos sem o PCI eram da ordem de 38% dos níveis encontrados nos controles, enquanto nos tratados com o PCI as concentrações de ATP eram de 57% dos níveis dos controles. Entretanto, o PCI não afetou os níveis totais de adenina nucleotídeos ao término do período de isquemia. Estes achados indicam que o PCI possivelmente favorece a síntese de ATP somente após a reperfusão, um efeito que poderia estar relacionado a um aumento nos níveis de Adenosina e redução nos níveis de xantina teciduais (58).

Selzner e colaboradores estudaram os efeitos do PCI sobre a produção de ATP em fígados esteatóticos. Utilizando um protocolo de isquemia de 70% do fígado por 75 minutos, reperfusão de 4 horas e um PCI de 10 minutos, os autores observaram que o uso do PCI permitiu uma atenuação na depleção de ATP após 4 e 24 horas de reperfusão, sendo o status energético semelhante ao dos animais de fígados normais tratados com o PCI. Ainda, os animais tratados

com o PCI apresentaram uma dramática redução na necrose e apoptose após a reperfusão. Os autores concluíram que o PCI foi uma estratégia efetiva, na medida em que preservou os níveis de ATP em ratos com fígados esteatóticos e não esteatóticos, além de ter impedido o desenvolvimento de morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (65).

A avaliação dos fluxos biliares com a aplicação do PCI foi avaliada por Nieuwenhuijs e colaboradores. Estes e outros autores (66, 67) consideram o fluxo biliar um importante marcador dos danos iniciais de isquemia e reperfusão, uma vez que reflete a função residual dos hepatócitos, enquanto a apoptose e a necrose refletem danos irreversíveis de um determinado número de hepatócitos. Estes autores utilizaram um modelo de isquemia de 45 minutos em 70% do fígado e 60 minutos de reperfusão em ratos com ou sem um PCI de 10 minutos. Os resultados demonstraram que os fluxos biliares após a reperfusão atingiram valores bem inferiores àqueles dos níveis de base, da ordem de 54% e 50% com e sem o PCI, respectivamente, e menores que o fluxo biliar do grupo controle em todos os tempos avaliados. Em contraste, a área sobre a curva calculada na reperfusão demonstrou diferença entre o grupo PCI e o grupo com isquemia isolada. Os autores ressaltaram que o fluxo biliar na reperfusão foi dependente do tempo que o órgão permaneceu em isquemia, e enfatizaram que, embora não tenham sido demonstradas lesões histopatológicas acentuadas, o achado foi consistente com outros autores, que demonstraram que a presença de necrose e apoptose é freqüentemente observada somente nas fases tardias da reperfusão. Os autores concluíram que a diminuição acentuada no fluxo biliar ocorreu por uma súbita diminuição na função de um grande número de hepatócitos, e não por lesões graves que provocam apoptose e necrose de uma pequena proporção de hepatócitos (68). Este mesmo grupo de pesquisadores estudou os efeitos do PCI em ratos jovens e velhos. Nos jovens, o PCI de 5 minutos restaurou o fluxo biliar em 42% dos valores de base, enquanto o PCI de 10 minutos restaurou o fluxo biliar em apenas 23% dos valores iniciais. Nos ratos velhos, o PCI falhou em



restaurar o fluxo biliar. A análise plasmática das transaminases e do lactato não demonstrou diferenças significativas entre os grupos, tanto nos ratos jovens como nos velhos. A análise histopatológica não demonstrou benefícios do PCI em nenhum grupo (69). A falha do PCI em proteger o fígado dos efeitos da isquemia e reperfusão em ratos velhos e em humanos com idade superior a 60 anos já havia sido observada por outros autores (70-72). De forma semelhante, outros estudos não conseguiram demonstrar efeitos positivos do uso do PCI em nível experimental em ratos cirróticos e em doadores de fígado para transplante (73, 74).

## **2.7 Efeitos do PCI sobre a Microcirculação Hepática**

Os principais determinantes dos danos induzidos pelo processo de isquemia e reperfusão sobre o fígado são a falha de perfusão capilar e a diminuição da oxigenação após o início da reperfusão (75). Desta forma, as alterações na oxigenação hepática podem fornecer indícios importantes dos efeitos do PCI. Um dos principais mecanismos sugeridos seria a participação do ON como um mediador do PCI. O ON é uma molécula biologicamente ativa sintetizada pela enzima NOS, a qual regula a perfusão da microcirculação hepática. Estudos prévios demonstraram que o tratamento de ratos com inibidores da NOS resultou em falha de perfusão hepática e necrose confluenta (76, 77). Outros estudos demonstraram os efeitos vasodilatadores do ON através do relaxamento das células de Ito, sua ação anti-inflamatória pela inibição da adesão de neutrófilos e agregação plaquetária (36, 78). Possíveis explicações para o desempenho positivo do PCI seriam a ação do ON promovendo uma inibição da síntese de ET-1, conforme já havia sido previamente demonstrado (49), ou o efeito regulador do ON sobre a liberação de Adenosina pelas células endoteliais (79).

Koti e colaboradores demonstraram as alterações da oxigenação hepática em ratos submetidos a um PCI de 5 minutos e 10 de reperfusão em um modelo de isquemia lobar de 70% do fígado durante 45 minutos, seguidos por 2 horas de reperfusão. Os autores concluíram que o PCI produziu um aumento significativo da oxigenação hepática e diminuição dos danos hepatocelulares ao término de duas horas de reperfusão, em comparação ao grupo que não realizou o PCI. A inibição da síntese do ON através do uso de L-NAME promoveu o bloqueio dos efeitos do PCI, com redução da oxigenação tissular e aumento dos danos hepatocelulares, enquanto a reposição de precursores do ON (L-arginina) também reduziu os danos hepatocelulares (80). Estes mesmos autores investigaram os efeitos do PCI sobre a oxigenação hepática em fígados com esteatose moderada. Os autores demonstraram diferenças significativas na oxigenação intra e extracelular, bem como menores danos hepatocelulares com a utilização do PCI. Os achados foram consistentes com uma melhora da perfusão sinusoidal, uma melhora da função mitocondrial e uma diminuição do metabolismo com preservação do ATP nos fígados esteatóticos pré-condicionados, semelhante ao encontrado por outros autores (73, 81-83).

## **2.8 Efeitos do PCI na Resposta Inflamatória Local e Sistêmica**

Foi demonstrado previamente que o PCI diminui a liberação de TNF- $\alpha$  e reduz os danos hepáticos e pulmonares, além de reduzir o recrutamento de neutrófilos circulantes nestes tecidos (49). Este recrutamento depende de interações entre leucócitos e endotélio, as quais são mediadas por várias famílias de moléculas de adesão, incluindo as P-selectinas e a ICAM-1 (84).

Os efeitos do PCI sobre diversos órgãos-alvo foram avaliados por Peralta e colaboradores. Utilizando um modelo experimental em ratos, com isquemia de 90 minutos seguidos por 90 minutos de reperfusão no lobo hepático direito e um protocolo de PCI de 10

minutos, os autores avaliaram os níveis de MPO no fígado, pulmões, pâncreas, intestino delgado e cólon, e observaram uma diminuição significativa na atividade da MPO tissular em todos os órgãos avaliados no grupo que realizou o PCI, exceto o fígado. Nos órgãos-alvo, contudo, houve um aumento da expressão da P-selectina nos sinusóides e células endoteliais, expressão esta que foi reduzida pelo PCI nos órgãos remotos, efeito que ocorreu por regulação da P-selectina pelo TNF- $\alpha$ . A avaliação histológica corroborou os achados bioquímicos, mostrando extensas lesões necróticas no fígado com isquemia e poucas lesões no grupo PCI. Quanto aos infiltrados neutrofilicos, entretanto, nenhuma diferença aparente foi observada entre os dois grupos. Nos órgãos-alvo, as lesões foram significativamente mais leves quando o PCI foi aplicado. Os autores sugerem que a proteção que o PCI confere ao fígado é independente do aumento da expressão de moléculas de adesão e do acúmulo de neutrófilos, mas que esta expressão é fundamental na proteção dos órgãos-alvo (85).

Os efeitos do PCI sobre o recrutamento de leucócitos foram avaliados através de microscopia intravital em 30 minutos, 2, 5, 12 e 24 horas utilizando um modelo de isquemia de 30 minutos e um PCI de 5 minutos, seguidos por 10 de reperfusão. Os resultados demonstraram reduções significativas no rolamento dos leucócitos, nos leucócitos em saltos e nos leucócitos aderentes em 30 minutos, em 5 e 12 horas no grupo PCI, quando comparados ao grupo sem o PCI. As interações entre leucócitos e endotélio diminuíram ao menos em 50% quando o PCI foi aplicado (86).

Os efeitos do PCI de 10 minutos sobre a ativação de neutrófilos foram estudados também em situação clínica. Choukèr e colaboradores realizaram hepatectomias em 75 pacientes. Os grupos foram semelhantes em relação ao tempo de ressecção, volume de fígado ressecado, tipo de hepatectomia realizada e doenças que motivaram a cirurgia. A concentração de PMN e a atividade da MPO foram semelhantes após 30 minutos de reperfusão nos grupos isquemia e PCI,

enquanto que a taxa de produção do radical livre superóxido estava diminuída no grupo PCI somente após 3 minutos de reperfusão e não foi significativa nos outros tempos avaliados (87).

Vajdová e colaboradores avaliaram os efeitos do PCI sobre a microcirculação hepática em ratos, utilizando microscopia intravital. Utilizando isquemia de 75 e 120 minutos seguida por 180 minutos de reperfusão, em um modelo de isquemia de 70% dos lobos hepáticos e um protocolo de PCI de 10 minutos, os autores demonstraram que os índices de perfusão sinusoidal após 180 minutos de reperfusão eram de 60% e 40% nos grupos que realizaram isquemia de 75 e 120 minutos, respectivamente, enquanto no grupo PCI os índices de perfusão sinusoidal foram significativamente melhores, da ordem de 80% e 60% após 75 e 120 minutos de isquemia, respectivamente. A atividade das células de Kupffer, medida por fagocitose de partículas de látex, obteve melhora nos grupos que realizaram o PCI somente após 75 minutos de isquemia, porém com 120 minutos não houve diminuição da atividade das células de Kupffer e a captação de partículas foi semelhante ao grupo que realizou somente isquemia. Consistentes com estes achados, os níveis de TNF- $\alpha$  tissulares mostraram melhora significativa somente no grupo PCI com isquemia de 75 minutos (88).

## **2.9 O PCI e as Vias de Sinalização Hepatoprotetoras**

Estudos prévios indicam que o PCI pode envolver múltiplos sinais extracelulares, mensageiros secundários intracelulares e mecanismos efetores. Aqueles que foram invocados como hepatoprotetores incluem a ativação de receptores A<sub>2</sub> da Adenosina e a indução da síntese do ON. Não está claro quais vias são essenciais ou como seus efeitos biológicos são modulados. A principal hipótese sugere que a liberação de RLO na fase de aplicação do PCI seria suficiente para ativar vias de sinalização intracelular redox-sensíveis. Outra hipótese seria que a consequência desta ativação provocaria uma resposta inibitória das vias que levam à morte

celular (89, 90). Sabe-se que muitas reações de fosforilação intracelulares, as quais regulam a proliferação e diferenciação celular, promovem a liberação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B regula numerosos genes envolvidos na resposta inflamatória, defesa celular e controle da proliferação e morte celular (61). Teoh e colaboradores utilizaram um modelo de PCI em ratos que aplicou um período de PCI de 2, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos nos lobos mediano e lateral esquerdo, seguido por 10 minutos de reperfusão antes do insulto isquêmico maior de 90 minutos. A atividade do NF- $\kappa$ B, neste estudo, aumentou após 30 minutos de reperfusão no grupo com o PCI de 10 minutos, e foi ausente ou retardada durante a reperfusão dos grupos sem o PCI. Os resultados confirmaram que a janela de proteção do PCI é de 5 ou 10 minutos, e que redução ou aumento nestes valores não oferece proteção (7, 61). A principal conclusão dos autores foi que o PCI induz hepatócitos quiescentes a entrar no ciclo celular, podendo este mecanismo estar ligado à ativação do NF- $\kappa$ B através de uma degradação na suas proteínas inibidoras (61).

Outros autores estudaram os efeitos do PCI avaliando os efeitos de tratamentos farmacológicos que modulam as proteínas de choque térmico (HSP) e proteína-kinases (MAPKs) em ratos com fígados normais e fígados esteatóticos. Os autores sugerem uma ligação entre a proteína de choque térmico heme oxigenase 1 (HO-1) com a atividade da proteína kinase C (PKC), conforme havia sido relatado previamente, fato que poderia ser explicado por uma maior liberação de RLO em fígados com esteatose. Ainda, os resultados demonstraram que a administração de indutores de HO-1 protegeu ambos os tipos de fígado (91, 92).

## **2.10 O PCI em Estudos Clínicos**

O primeiro estudo clínico demonstrando os efeitos protetores do PCI foi conduzido por Clavien e colaboradores e relatado em 2000. Neste estudo piloto, os autores realizaram 12

hepatectomias utilizando o PCI, comparadas a um grupo de 12 indivíduos sem o PCI, e concluíram que o PCI é um método simples e efetivo de proteção contra períodos prolongados de isquemia (81). Posteriormente, este mesmo autor relatou os resultados do uso do PCI de 10 minutos em 50 indivíduos submetidos a ressecções de mais do que dois segmentos hepáticos, com oclusão do pedículo hepático aferente, comparados a um grupo de 50 indivíduos sem o PCI. Os grupos foram semelhantes em termos de idade, sexo, tempo de interrupção do fluxo sanguíneo, volume de fígado ressecado e sangramento intra-operatório. Não foram observadas diferenças em termos de permanência em UTI, internação hospitalar e complicações cirúrgicas e não-cirúrgicas entre os grupos. Os picos dos níveis das transaminases hepáticas foram significativamente menores nos indivíduos do grupo PCI com idade inferior a 60 anos. A análise por regressão multivariada demonstrou benefício inversamente proporcional à idade, sendo que nos pacientes com mais de 70 anos os efeitos do PCI foram negativos. A proporção de tecido ressecado também interferiu nos resultados, sendo que as hepatectomias de menos que 50% da massa hepática obtiveram benefício com o uso do PCI, enquanto não foram observados benefícios nas ressecções de mais que 50% do volume total. Houve também uma tendência de redução das transaminases nas ressecções com duração maior que 40 minutos que ficou muito próxima da significância estatística, enquanto a redução das transaminases foi mais modesta nas ressecções com tempos menores que 40 minutos. Um pequeno número de fígados que apresentavam fibrose periportal leve apresentou benefícios semelhantes aos fígados normais. Nos fígados com esteatose maior que 25%, os benefícios do PCI foram particularmente intensos na redução da atividade das transaminases. A análise dos níveis de ATP no tecido hepático no início da cirurgia e após 30 minutos de reperfusão em uma amostra restrita da série demonstrou que o PCI preservou os níveis de ATP naqueles com idade inferior a 60 anos. O efeito foi inverso com

idade maior que 60 anos. Os autores sugerem que outras estratégias, como o Clampeamento Intermitente, deveriam ser tentadas em indivíduos com idade superior a 60 anos (70).

Outro ensaio clínico recente comparou os efeitos do PCI e do Clampeamento Intermitente em indivíduos submetidos a ressecções hepáticas. Setenta e três pacientes foram randomizados para receber um dos tratamentos propostos e ressecção de pelo menos dois segmentos hepáticos. O PCI consistiu de clampeamento de 10 minutos e 10 minutos de reperfusão, enquanto no grupo intermitente foram realizados dois clampeamentos de 15 minutos, separados por 5 minutos de reperfusão. Os resultados demonstraram que os grupos foram semelhantes em todos os parâmetros de seleção. O sangramento operatório, o tempo de transecção e a quantidade de transfusões foram significativamente menores no grupo PCI, enquanto os níveis de transaminases, complicações cirúrgicas, tempo de permanência hospitalar e permanência em UTI foram semelhantes entre os grupos. Entretanto, houve uma correlação negativa entre a idade e os níveis das transaminases, sendo que os indivíduos com idade mais avançada obtiveram pouco benefício com o uso do PCI. A mortalidade da série foi de 1.6%. Os autores concluíram que ambas as estratégias são igualmente efetivas em prevenir os danos hepáticos, porém o PCI tem as vantagens de menor sangramento e menor tempo de transecção do parênquima, enquanto o Clampeamento Intermitente foi superior nos pacientes com idade superior a 65 anos (71).

Posteriormente, outro ensaio clínico randomizado avaliou os efeitos do PCI de 10 minutos sob Exclusão Vascular Total com preservação do fluxo da veia cava. Sessenta indivíduos foram divididos em um grupo com e outro sem o PCI. Os grupos foram semelhantes em 24 parâmetros analisados, e as atividades das transaminases hepáticas, glutathione transferase, tempo de protrombina e bilirrubinas foram semelhantes nos grupos. Dois óbitos ocorreram no grupo PCI, o primeiro por isquemia intestinal e o segundo por insuficiência hepática. O único parâmetro associado a uma elevação das transaminases na análise multivariada foi a depuração do verde de

indocianina no pré-operatório. Os autores ressaltaram que o PCI não mostrou melhora da função hepática e que a discrepância com os ensaios previamente relatados poderia estar relacionada à falta de fluxo retrógrado pelas veias hepáticas, que ocorre com a técnica de Exclusão Vascular Total, ou por um discreto aumento nos tempos de ressecção, que foram, em média, 10 minutos superiores aos que Clavien e colaboradores haviam relatado. Concluem que o PCI não é uma ferramenta útil e não recomendam seu uso quando se utiliza a técnica de Exclusão Vascular Total no fígado (93).

Uma meta-análise publicada recentemente avaliou os efeitos do PCI em doadores de fígado para transplante. Dos 162 doadores de fígado avaliados, 78 foram randomizados para ser submetidos ao PCI, enquanto 84 não foram. Não houve diferença estatística quanto à mortalidade, disfunção primária, disfunção inicial, retransplante, tempo de internação em UTI, níveis das transaminases, bilirrubinas, atividade da protrombina, atividade da MPO, NOS e apoptose nos enxertos transplantados com ou sem o PCI. Os autores concluíram que não há evidências suficientes para recomendar ou refutar o uso do PCI em doadores de fígado, e que novos ensaios clínicos são necessários para identificar o melhor estímulo isquêmico durante a captação do fígado para transplante (94).



### 3. Referências Bibliográficas

1. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1998;5(4):402-8.
2. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg.* 2003 May-Jun;16(3):127-40.
3. Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 2002 Nov 1;33(9):1200-8.
4. Cutrin JC, Boveris A, Zingaro B, Corvetti G, Poli G. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia-reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology.* 2000 Mar;31(3):622-32.
5. Castro e Silva Jr Od, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir Bras.* 2002;17:96-100.
6. Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest.* 1993 Feb;91(2):456-64.
7. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology.* 1998 Sep;28(3):768-73.
8. Dinant S, van Veen SQ, Roseboom HJ, van Vliet AK, van Gulik TM. Liver protection by hypothermic perfusion at different temperatures during total vascular exclusion. *Liver Int.* 2006 May;26(4):486-93.
9. Yamanaka N, Dai CL, Okamoto E. Historical evolution of hypothermic liver surgery. *World J Surg.* 1998 Oct;22(10):1104-7.
10. An J, Camara AK, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jun;288(6):H2620-7.
11. Lee YJ, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, et al. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 May;27(5):950-62.
12. Raffucci FL. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. *Surgery.* 1953 Mar;33(3):342-51.

13. Longmire WP, Jr., Marable SA. Clinical experiences with major hepatic resections. *Ann Surg.* 1961 Sep;154:460-74.
14. Fortner JG, Shiu MH, Howland WS, Gaston JP, Kunlin A, Kawano N, et al. A new concept for hepatic lobectomy. Experimental studies and clinical application. *Arch Surg.* 1971 Apr;102(4):312-5.
15. Imakita M, Yamanaka N, Kuroda N, Kitayama Y, Okamoto E. Does topical cooling alleviate ischemia/reperfusion injury during inflow occlusion in hepatectomy? Results of an experimental and clinical study. *Surg Today.* 2000;30(9):795-804.
16. Yamanaka N, Okamoto E, Furukawa K, Oriyama T, Fujimoto J, Kanno H, et al. Hepatic resection under in situ hemihepatic hypothermic perfusion with hepatoprotective agents. *Hepatogastroenterology.* 1995 Feb;42(1):1-4.
17. Kim YI, Kobayashi M, Nakashima K, Aramaki M, Yoshida T, Mitarai Y. In situ and surface liver cooling with prolonged inflow occlusion during hepatectomy in patients with chronic liver disease. *Arch Surg.* 1994 Jun;129(6):620-4.
18. Yamanaka N, Okamoto E, Fujiwara S, Oriyama T, Fujimoto J, Kato T, et al. [Hepatic resection under liver surface or perfusion cooling together with hepatoprotective agents of PGE1 and urinastatin]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1993 Mar;94(3):259-68.
19. Yamanaka N, Yamanaka J, Tanaka T, Tanaka W, Yasui C, Ando T, et al. Topical cooling assisted hepatic resection of segment 7 and 8 oriented by en-bloc interruption of the targeted portal pedicles. *Hepatogastroenterology.* 1999 Jan-Feb;46(25):417-24.
20. Hannoun L, Delriviere L, Gibbs P, Borie D, Vaillant JC, Delva E. Major extended hepatic resections in diseased livers using hypothermic protection: preliminary results from the first 12 patients treated with this new technique. *J Am Coll Surg.* 1996 Dec;183(6):597-605.
21. Azoulay D, Eshkenazy R, Andreani P, Castaing D, Adam R, Ichai P, et al. In situ hypothermic perfusion of the liver versus standard total vascular exclusion for complex liver resection. *Ann Surg.* 2005 Feb;241(2):277-85.
22. Ohya T, Ohwada S, Morishita Y. Does hypothermic perfusion have beneficial effects for ischemic liver during extended hepatectomy with hepatic inflow occlusion of canine liver? A comparative study with topical cooling. *Hepatogastroenterology.* 1998 Mar-Apr;45(20):477-82.
23. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988 Apr;45(4):673-6.
24. Satas S, Loberg EM, Porter H, Whitelaw A, Steen PA, Thoresen M. Effect of global hypoxia-ischaemia followed by 24 h of mild hypothermia on organ pathology and biochemistry in a newborn pig survival model. *Biol Neonate.* 2003;83(2):146-56.

25. Takahashi K, Morikawa S, Inubushi T, Nosaka S. Protective effects of moderate hypothermia on phosphoenergetic metabolism in rat liver during gradual hypoxia studied by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Surg Res.* 2004 Apr;117(2):323-8.
26. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation.* 2001 Nov 15;72(9):1486-90.
27. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int.* 2006 Aug;26(6):734-41.
28. Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, et al. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2003 Oct 15;35(8):901-9.
29. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR, Jr. Mild therapeutic hypothermia for postischemic vasoconstriction in the perfused rat liver. *Anesthesiology.* 1999 Apr;90(4):1103-11.
30. Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, van Gulik TM. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs. *Surgery.* 2003 Nov;134(5):806-17.
31. Niemann CU, Choi S, Behrends M, Hirose R, Noh J, Coatney JL, et al. Mild hypothermia protects obese rats from fulminant hepatic necrosis induced by ischemia-reperfusion. *Surgery.* 2006 Sep;140(3):404-12.
32. Choi S, Noh J, Hirose R, Ferell L, Bedolli M, Roberts JP, et al. Mild hypothermia provides significant protection against ischemia/reperfusion injury in livers of obese and lean rats. *Ann Surg.* 2005 Mar;241(3):470-6.
33. Wu X, Stezoski J, Safar P, Bauer A, Tuerler A, Schwarz N, et al. Mild hypothermia during hemorrhagic shock in rats improves survival without significant effects on inflammatory responses. *Crit Care Med.* 2003 Jan;31(1):195-202.
34. Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, et al. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock.* 1996 Jan;5(1):34-40.
35. Coletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell Jr. DA. Role of tumor necrosis-alpha in the pathophysiologic alteration after hepatic/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990;85:1936-46.
36. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Aug;139(2):213-26.

37. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation*. 1997 Jan 15;63(1):143-8.
38. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)*. 2001 Jan;200(2):93-105.
39. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Apr;282(4):G608-16.
40. Kuboki S, Okaya T, Schuster R, Blanchard J, Denenberg A, Wong HR, et al. Hepatocyte NF-kappaB activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jan;292(1):G201-7.
41. Bradham CA, Schemmer P, Stachlewitz RF, Thurman RG, Brenner DA. Activation of nuclear factor-kappaB during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells. *Liver Transpl Surg*. 1999 Jul;5(4):282-93.
42. Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest*. 2002 Jul;110(2):193-202.
43. Xu Y, Bialik S, Jones BE, Iimuro Y, Kitsis RN, Srinivasan A, et al. NF-kappaB inactivation converts a hepatocyte cell line TNF-alpha response from proliferation to apoptosis. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 1):C1058-66.
44. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg*. 2000 Dec;191(6):650-6.
45. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg*. 2005 Apr;140(4):405-9; discussion 10.
46. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, et al. Pharmacological stimulation of adenosine A2 receptors supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999;126:945-54.
47. Nilsson B, Friman S, Wallin M, Gustafsson B, Delbro D. The liver protective effect of ischemic preconditioning may be mediated by adenosine. *Transpl Int*. 2000;13 Suppl 1:S558-61.
48. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997 Apr;25(4):934-7.

49. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*. 1999 Jan;29(1):126-32.
50. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 1998 Jul 27;66(2):152-7.
51. Zhang SJ, Zhu CJ, Zhao YF, Li J, Guo WZ. Different ischemic preconditioning for rat liver graft: protection and mechanism. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2003 Nov;2(4):509-12.
52. Grande L, Roselló-Catafau J, Peralta C. El precondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp*. 2006;80:275-82.
53. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*. 1991 Mar;260(3 Pt 1):G355-62.
54. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 1994 Oct;26(5):509-17.
55. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, et al. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl*. 2002 Nov;8(11):990-9.
56. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol*. 2003 Jan;38(1):59-66.
57. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul;279(1):G163-71.
58. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock*. 2005 Oct;24(4):370-5.
59. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol*. 2003 Dec;39(6):972-7.
60. Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 28;11(12):1825-8.
61. Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology*. 2002 Jul;36(1):94-102.

62. Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec 1;31(11):1405-16.
63. Lee WY, Lee SM. Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 27;349(3):1087-93.
64. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman M, Prats N, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology.* 2001 Dec;34(6):1164-73.
65. Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *J Hepatol.* 2003 Jul;39(1):55-61.
66. Accatino L, Pizarro M, Solis N, Arrese M, Koenig CS. Bile secretory function after warm hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Liver Transpl.* 2003 Nov;9(11):1199-210.
67. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow-an index of ischemic injury. *J Surg Res.* 1987 May;42(5):565-9.
68. Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia/reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2007 Nov;52(11):3029-37.
69. Schiesser M, Wittert A, Nieuwenhuijs VB, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Intermittent ischemia but not ischemic preconditioning is effective in restoring bile flow after ischemia reperfusion injury in the livers of aged rats. *J Surg Res.* 2008 Feb 1.
70. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg.* 2003 Dec;238(6):843-50; discussion 51-2.
71. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg.* 2006 Dec;244(6):921-8; discussion 8-30.
72. Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl.* 2007 Mar;13(3):382-90.
73. Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):1538-40.

74. Pacheco EG, Gomes MCJ, Rodrigues GR, Campos W, Kemp R, Castro e Silva Od. Effect of liver ischemic preconditioning in cirrhotic rats submitted to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2006;21:24-8.
75. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994 Dec;145(6):1421-31.
76. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol.* 1992 Oct;52(4):390-4.
77. Shibayama Y, Nakata K. Role of septal fibrosis in development of hepatic circulatory disturbance in the presence of liver cell enlargement. *Liver.* 1992 Apr;12(2):84-9.
78. Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest.* 1995 Mar;95(3):1199-206.
79. Smits P, Williams SB, Lipson DE, Banitt P, Rongen GA, Creager MA. Endothelial release of nitric oxide contributes to the vasodilator effect of adenosine in humans. *Circulation.* 1995 Oct 15;92(8):2135-41.
80. Koti RS, Seifalian AM, McBride AG, Yang W, Davidson BR. The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver. *FASEB J.* 2002 Oct;16(12):1654-6.
81. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000 Aug;232(2):155-62.
82. Makuuchi M, Mori T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet.* 1987 Feb;164(2):155-8.
83. Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol.* 2002 Aug;161(2):587-601.
84. Panes J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 1998 May;114(5):1066-90.
85. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001 Jan;33(1):100-13.
86. Sawaya DE, Jr., Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, et al. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res.* 1999 Jul;85(1):163-70.

87. Choukèr A, Martignoni A, Schauer R, Dugas M, Rau HG, Jauch KW, et al. Beneficial effects of ischemic preconditioning in patients undergoing hepatectomy: the role of neutrophils. *Arch Surg*. 2005 Feb;140(2):129-36.
88. Vajdová K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl*. 2004 Apr;10(4):520-8.
89. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature*. 1993 Sep 9;365(6442):182-5.
90. Schmid RM, Adler G. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*. 2000 Jun;118(6):1208-28.
91. Anwar AA, Li FY, Leake DS, Ishii T, Mann GE, Siow RC. Induction of heme oxygenase 1 by moderately oxidized low-density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells: role of mitogen-activated protein kinases and Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jul 15;39(2):227-36.
92. Terry CM, Cliekeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca<sup>2+</sup>, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5 Pt 2):H1493-501.
93. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebah M, Ichai P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg*. 2006 Feb;202(2):203-11.
94. Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic preconditioning for liver transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(1):CD006315.



## 4. Objetivos

- Desenvolvimento de um modelo cirúrgico experimental de isquemia e reperfusão em ratos que inclui a utilização de Hipotermia Hepática Tópica associada ao Pré-condicionamento Isquêmico.
- Análise dos danos hepatocelulares, da função hepática e das defesas antioxidantes em ratos submetidos à isquemia do fígado de 90 minutos de duração, seguidos por reperfusão do órgão de 120 minutos nas seguintes condições:
  - a) Normotermia.
  - b) Utilizando Pré-condicionamento Isquêmico.
  - c) Induzindo Hipotermia Hepática Tópica a 26°C.
  - d) Associando o Pré-condicionamento Isquêmico com a Hipotermia Hepática Tópica a 26°C.
- Avaliar a existência de efeitos sinérgicos com a aplicação de Hipotermia Hepática Tópica a 26°C associada com o Pré-condicionamento Isquêmico.

## **5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS**

### **TOPICAL HYPOTHERMIA PLUS ISCHEMIC PRECONDITIONING: LIVER INJURIES, HEPATIC FUNCTION AND OXIDANT DEFENSES AT INITIAL REPERFUSION IN RATS**

Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho<sup>1</sup>, Tais Burmann de Mendonça<sup>2</sup>, Norma Anair Possa Marroni<sup>3</sup>, Cleber Dario Pinto Kruehl<sup>4</sup>, Carlos Otavio Corso<sup>5</sup>

**Study performed at the Animal Experimentation Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.**

---

<sup>1</sup> MD, Fellow PhD degree, Department of Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Graduate Student, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup> Physiologist, PhD, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup> MD, PhD, Adjunct Professor, Department of Surgery, Post Graduation Course, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>5</sup> MD, PhD, Associate Professor, Department of Morphological Sciences, Post Graduation Course, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

## Abstract

**Background/Aims:** Hypothermia and Ischemic Preconditioning (IPC) are known to protect against ischemia/reperfusion (I/R) injury in liver resections. The mechanisms are not completely elucidated and the use of these techniques together was not assessed until the present moment.

**Methods:** Rats were subjected to partial (70%) hepatic ischemia during 90 minutes and 120 minutes of reperfusion. Five groups were studied: Control (C), Normothermic Ischemia (NI), Ischemic Preconditioning (IPC), Hypothermia 26°C (H), and Hypothermia 26°C plus IPC. IPC consisted of 10 minutes of ischemia and reperfusion before the ischemic insult and the hypothermia was induced by the superfusion of cooled saline on the ischemic lobes. Mean arterial pressure (MAP), body temperature and bile flow were recorded every 15 minutes and hepatic injury, lipid peroxidation and antioxidant defenses were assessed at the end of reperfusion. **Results:** MAP and body temperatures remained constant throughout the entire experiment. Bile flow in the H and H+IPC groups returned to levels similar to control after 45 minutes of reperfusion and were significantly higher in comparison to the NI and IPC groups after 105 minutes ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) and 120 minutes ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ). Plasmatic levels of AST and ALT were significantly higher in the NI ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) and IPC ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) groups in comparison to the C group. TBARS were significantly lower in the H+IPC group in comparison to the NI ( $P<0.01$ ), IPC and H ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ). Catalase levels were significantly higher in the IPC group in comparison to the C ( $P<0.01$ ), NI and H+IPC ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) groups. SOD levels were significantly higher in the H group in comparison to the C ( $P=0.01$ ), NI, PCI and H+IPC ( $P<0.05$ , respectively) groups. **Conclusion:** Topical hypothermia associated or not to IPC protected the ischemic liver against ischemia/reperfusion injuries and

allowed an early recovery of the hepatic function possibly related to attenuation of oxidative stress and ATP preservation.

## Introduction

Ischemia-reperfusion injury (I/R) is a major cause of morbidity and mortality in liver surgery and transplantation. In order to attenuate the deleterious effects of I/R, some strategies such as topical Hypothermia and IPC have been used with proven benefits (1, 2).

The protective effect of hypothermia has been attributed to a reduction of liver metabolism and the subsequent decrease of oxygen requirement that occurs with a temperature decrease. In addition, the prevention of liver injuries promoted by attenuation of oxidative stress also plays an important role (3, 4). Contrary to hypothermia applied through whole body temperature cooling or *in situ* perfusion cooling, topical hypothermia is a simple, fast, and low cost technique, which is not associated with hemodynamic imbalance and body temperature decrease. There is growing evidence that even mild or moderate hypothermia evokes functional protection against I/R injury (4-6). On the other hand, IPC is an inducible and potent endogenous mechanism by which repeated episodes of brief I/R confer a state of protection against subsequent sustained ischemia. While a number of protective mediators have been identified such as adenosine (7), nitric oxide (8) or various kinases (9-11), the triggering mechanism of protection remains unknown. One of the possible protective mechanisms is related to a reduction of oxidative stress (12). In the present study the authors evaluated the occurrence of protective synergistic effects when both techniques are associated as well as the hepatocellular injuries, liver function and antioxidant defenses at the initial phase of the reperfusion.

## Material and Methods

### *Animals*

This study was approved by the Bioethical Committee of the Post-Graduation Group of the HCPA-UFRGS, which adheres to the rules of the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS). Male Wistar rats weighting 200-250g were used in all experiments. Animals were fed on a laboratory diet with water and food *ad libitum* until the night before the experiment and were kept under constant environmental conditions with 12-h light–dark cycles.

### *Anesthesia and Surgical Procedures*

After 12 hours fasting, animals were anesthetized with ketamin sulfate 75 mg/kg (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, Brazil) and Xylazin (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, Brazil) 10 mg/kg by intraperitoneal injection. One-third supplements of the initial dose were administered when necessary. Animals were placed in supine position on a heated pad for maintenance of body temperature. The rectal temperature was measured at 15 minutes intervals by a digital thermometer and adjusted to 35.5°C - 37.5°C when necessary by a heating lamp. A polypropylene catheter (Portex PE-50, Hythe, Kent, UK) was inserted into the right carotid artery for recording of MAP (Sirecust 304D Siemens, Munich, Germany) every 15 minutes and continuous volume replacement with normal saline (2 ml/h). Oxygen (0.5 l/min) was administrated by a face mask (Figure 1). The liver was exposed through an upper abdominal transverse incision, retractors were positioned on the rib cage and the liver was released from its ligaments. The bile duct was canulated (Portex PE-50, Hythe, Kent, UK) and exteriorized by a counter incision in the inferior abdomen. Bile volumes were measured at 15 minutes intervals. To induce hepatic ischemia, the blood supply to the left and median liver lobes was interrupted by

placement of an atraumatic microvascular clip (Medicon, Tuttlingen, Germany) at the level of the hepatic artery and portal vein, without inclusion of the correspondent biliary ducts (Figure 2). The un-occluded right and caudate lobes allowed outflow from the splanchnic circulation, thus avoiding venous congestion. After the start of liver ischemia, the top of the surgical table was elevated to 30 degrees and the median and lateral liver lobes carefully mobilized into a polyethylene concave device designed to isolate the liver in the abdominal cavity, similar to previous descriptions by other authors (13). A flexible intraparenchymal probe (IT-23, 0.5mm, Braintree Scientifics, Boston, USA) connected to a digital thermometer (Thermalert - TH5, Braintree Scientifics, Boston, USA) was inserted five millimeters deep within the central region of the ischemic left lateral lobe and the temperature was adjusted to 26°C by cooled saline solution superfusion in the H and H+IPC groups (Figure 3). To avoid spillover of the cooled saline solution to the abdominal cavity and consecutive systemic cooling of the animal, a suction system was installed to remove fluid (Figure 4). IPC consisted of 10 minutes of warm ischemia and 10 minutes of reperfusion before the prolonged ischemia only in the IPC and H+IPC groups. After 90 minutes of ischemia, the clip was removed and the liver reperfused for 120 minutes. At the end of the experiment animals were killed by carotid exsanguination and blood samples were collected. Thereafter, the liver weight was determined and a segment of the previously ischemic lobes was cut in cubes, immediately frozen in liquid nitrogen and kept in a – 80°C freezer, whereas another fragment was fixed in 4% formaldehyde.

### *Experimental Design*

#### *1. Control Group (C)*

Animals underwent laparotomy and all preparation remaining without hepatic ischemia during the entire experiment, (n=4).

## *2. Normothermic Ischemia Group (NI)*

Livers were subjected to ischemia of the median and lateral lobes for 90 minutes and subsequent reperfusion for 120 minutes, (n=7).

## *3. Ischemic Preconditioning Group (IPC)*

Ischemic preconditioning consisted of 10 minutes of warm ischemia and 10 minutes of reperfusion. Thereafter, the preconditioned liver lobes were exposed to 90 minutes of ischemia followed by 120 minutes of reperfusion, (n= 7).

## *4. Hypothermia Group (H)*

Immediately after the ischemia had begun, the median and left lateral liver lobes were cooled to 26°C for 90 minutes. Thereafter, the livers were reperfused for 120 minutes in normothermia, (n=7).

## *5. Hypothermia plus Ischemic Preconditioning Group (H+IPC)*

Ischemic preconditioning consisted of 10 minutes of warm ischemia and 10 minutes of reperfusion. Immediately after the ischemia had begun, the median and left lateral liver lobes were cooled to 26°C for 90 minutes. Thereafter, the livers were reperfused for 120 minutes in normothermia, (n=7).

## *Bile Flow*

Bile samples were collected every 15 min by siphoning. Bile volume was determined gravimetrically, assuming a density of 1.0 g/ml, and the results were expressed as microliters per minute per gram of wet weight liver.

## *Liver Enzymes*

Blood samples were taken from the carotid artery at the end of the experiment, immediately centrifuged at 4000Xg for 10 min, and stored at -80°C. Serum aspartate aminotransferase (AST) alanine aminotransferase (ALT) were measured by means of automated analyzer (Modular P800 Hitachi, Roche-Boehringer, Mannheim, Germany).

#### *TBARS*

The determination of the TBARS was performed using the Buege and Aust method (14). The liver was homogenized with trichloroacetic acid 10% and a solution of tiobarbituric acid 0.67% plus sodium sulfate 7.1%. Thereafter, the composition was heated to 100°C for 30 minutes and then cooled in ice for 10 minutes. After that, n-butyl alcohol was added to the composition and the homogenate agitated for 30 seconds in a Vortex system and centrifuged (2000Xg) for 5 min. The supernatant obtained, which is product of the reaction of the lipoperoxides was transferred to a plate for reading in a 535 nm wavelength spectrophotometer. The results were expressed in nanomoles per milligram of protein (nmol/mg.prot).

#### *Catalase*

The activity of Catalase was evaluated according to the method described by Boveris and Chance (15). Phosphate buffer 50 mM (ph 7.0) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to the liver homogenate. The rate of decomposition of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 M) added to the homogenate was determined by reading in a 240 nm wavelength spectrophotometer. The results were expressed in picomoles per milligram of protein (pmoles/mg.prot).

#### *SOD*



The activity of the antioxidant enzyme SOD was evaluated using a technique described by Mirsa and Fridovich (16). Glicyn buffer 50 mM (pH 11.0) and adrenalin were inserted into a plate of 96 wells containing liver homogenate. The ability of the SOD to inhibit the reaction of superoxide radical was determined by reading in a 480 nm wavelength spectrophotometer. The results were expressed in units of SOD per milligrams of protein (USOD/mg.prot).

### *Liver Histology*

One pathologist in a blinded fashion assessed HE sections looking at three tissue injury parameters: hydropic degeneration, hepatocellular necrosis and neutrophilic infiltrates. All ranged in score from 0 until 4. The sum of histopathological injury score was recorded for each specimen and the data expressed as means for each group.

### *Statistics*

Data were analyzed for statistical significance by Analysis of Variance (One-way ANOVA or ANOVA on ranks) and multiple comparison tests when appropriated (Tukey, Student-Neuman-Keuls and Dunn) using a statistical software package (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Correlations were analyzed by Spearman coefficient. Data are given as Mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM) and *P* values less than 0.05 were considered as significant.

## Results

### *Macrohemodynamic Parameters and Body Temperature*

In all groups, the MAP and body temperature remained constant throughout the entire experiment. There was no significant difference between animals subjected to topical hypothermia, normothermic ischemia, and sham-operated controls.

MAP means ranged from  $76.5 \pm 3.1$  mmHg to  $83.8 \pm 1.8$  mmHg in the C group,  $83.3 \pm 4.5$  mmHg to  $101.0 \pm 5.8$  mmHg in the IN group,  $86.3 \pm 3.2$  mmHg to  $97.9 \pm 6.1$  mmHg in the IPC group,  $82.6 \pm 4.4$  mmHg to  $94.7 \pm 4.2$  mmHg in the H+IPC group and  $84.7 \pm 5.0$  mmHg to  $97.3 \pm 6.7$  mmHg in the H group.

Body temperature means ranged from  $36.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  to  $37.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$  in the C group,  $36.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  to  $37.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$  in the NI group,  $36.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  to  $37.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in the IPC group,  $36.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$  to  $37.2 \pm 0.2$  in the H+IPC group and  $35.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$  to  $37.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in the H group.

### *Liver Enzymes*

#### *AST*

At the end of reperfusion the mean serum levels of AST in the C group were  $279 \pm 36$  IU/L, whereas in the NI group were significantly increased to  $3910 \pm 1049$  IU/L ( $P < 0.05$  vs. C group). As in the NI group, in the IPC group the AST mean levels were significantly increased to  $4207 \pm 725$  IU/L ( $P < 0.05$  vs. C group). In the H group the mean AST levels were  $3074 \pm 832$  IU/L, whereas in the H+IPC group the mean AST levels were  $3101 \pm 450$  IU/L (Figure 5).

#### *ALT*

At the end of reperfusion the mean serum levels of ALT in the C group were  $107 \pm 40$  IU/L, whereas in the NI group were significantly increased to  $4660 \pm 1371$  IU/L ( $P < 0.05$  vs. C group). As in the NI group, in the IPC group the mean ALT levels were significantly increased to  $4086 \pm 832$  IU/L ( $P < 0.05$  vs. C group). In the H group the mean ALT levels were  $1637 \pm 404$  IU/L, whereas in the H+IPC group the mean ALT levels were  $2878 \pm 629$  IU/L (Figure 5).

### *Bile Flow*

Cross-clamping of the portal inflow reduced the rate of bile flow in all groups in comparison to C group. However, during 90 minutes of ischemia, the bile flow in the NI and IPC groups were significantly higher in comparison to the H+IPC and H groups. Table 1.

**Table 1: Bile flow rates throughout ischemia ( $\mu\text{l/g}\cdot\text{min}$ )**

| <i>Group</i> | <i>Mean</i>           | <i>SEM</i> |
|--------------|-----------------------|------------|
| C            | 0.0591*               | 0.0039     |
| NI           | 0.0230 <sup># +</sup> | 0.0054     |
| IPC          | 0.0259 <sup>†</sup>   | 0.0044     |
| H            | 0.0197                | 0.0052     |
| H+IPC        | 0.0207                | 0.0041     |

\* $P<0.01$  vs. all groups. #  $P=0.01$  vs. H+IPC,  $^+P<0.05$  vs. H.  
 $^{\dagger} P<0.01$  vs. H+IPC and H. Data expressed as Mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Tukey post hoc test.

After the reperfusion, bile flow in the H+IPC and H groups returned to levels similar to the C group after 45 minutes of reperfusion and were higher in comparison to the NI and IPC groups after 105 minutes ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) and 120 minutes ( $P<0.05$  and  $P<0.05$ ) (Figure 6).

### *TBARS, Catalase and SOD*

At the end of the experiment, lipid peroxidation and antioxidant defenses were evaluated in liver tissue. TBARS levels in the liver tissue showed significant difference in the H+IPC group in comparison to other treatment groups, but not to control group (Figure 7). The activity of the

intracellular antioxidant enzyme Catalase was determined in liver tissue at the end of reperfusion. Significantly higher activity was seen in the IPC group when compared to the C, NI, and H+IPC groups (Figure 8). In contrast, the antioxidant enzyme SOD showed significant increase in the H group in comparison to all other groups (Figure 9).

### *Correlations*

In the H group there was a negative correlation between AST and ALT with bile flow ( $r = -0.88$ ,  $P < 0.05$  and  $r = -0.87$ ,  $P < 0.01$ , respectively), whereas a positive correlation was observed between AST and ALT with TBARS ( $r = 0.92$ ,  $P < 0.01$  and  $r = 0.78$ ,  $P < 0.05$ , respectively).

### *Histopathological Score*

The mean scores in every group are presented in Figure 10. A significant difference was observed in the NI group in comparison to C group ( $P < 0.05$ ). The degree of the injuries was considered as mild in all groups.

## Discussion

In the current study the effects of the association of topical hypothermia and IPC in a model of ischemia and reperfusion were evaluated. Both are considered two important surgical tools of protection against ischemia and reperfusion injuries, but to the knowledge of the authors, this is the first report of the simultaneous use of both techniques on the liver, whereas this combination was already reported in brain and heart surgery (17, 18). The protective mechanisms are not completely understood, but the attenuation of the damage caused by radical oxygen species (ROS) generated after the reperfusion seems to be, at least in part, a mechanism found in

both techniques (6, 12). It has also been demonstrated that the oxidant stress depends on the intraischemic temperature and hypothermia possibly attenuates the inflammatory response even with a low decrease of temperature, possibly by a reduction in neutrophil recruitment and prevention of the no reflow phenomenon (4, 5, 19). In agreement with these findings and similar to Kato et al, we observed that the induction of topical hypothermia allowed a homogenous macroscopic perfusion of the ischemic liver lobes immediately after reperfusion, whereas in the normothermic groups, several areas of heterogeneous perfusion were observed. This macroscopic finding possibly is related to an attenuation of the no reflow phenomenon after the reperfusion promoted by hypothermia, an effect also observed by others at different temperatures (13).

In the current study, the induction of 26°C topical hypothermia was not associated to hemodynamic disturbances during the experiments and the whole body temperature was similar in all groups. Thus, any possible influence of the MAP and body temperature in the results obtained can be discarded. In line with these findings, others have demonstrated that topical hypothermia is safe and has no influence on the hemodynamic and animal temperature (3, 4, 22, 23). According to Yamanaka et al, the use of topical hypothermia could offer benefits in any resection that needs interruption of the afferent blood flow (2).

The results showed that after 90 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion, liver concentrations of TBARS, which is a sensitive marker of cell membrane lipid peroxidation, showed a significant decrease in the H+IPC group in comparison to other treatment groups. This finding suggests a synergistic protective effect when hypothermia and IPC are associated and demonstrates that both hypothermia and IPC seem to have a strong influence on the injuries caused by the ROS (5, 13). This protection, in the case of hypothermia, was possibly related to an inhibition of the superoxide radical release, since the induction of topical hypothermia at 26°C allowed a significant preservation of the SOD activity. The association of hypothermia plus IPC,

however, attenuated this response. Possible explanations to the protective effect of hypothermia could be related to a decrease in the metabolic rate and reduction of the activity of Kupffer cells, which are the main source of superoxide radicals at the initial reperfusion. In addition, other reports have demonstrated that hypothermia is related to prevention of mitochondrial integrity at reperfusion, another source of superoxide radicals (24). On the other hand, IPC seems to have influence on the intracellular xanthine metabolism and prevention of hydrogen peroxides release, since IPC promoted a significant preservation of Catalase levels. Hypothermia, in contrast, attenuated Catalase preservation promoted by IPC. Thus, hypothermia and IPC seem to act in the liver oxidant system in different ways. Possible explanations to lower Catalase activity when hypothermia is applied might be related to a decrease of AMP hydrolysis and lower xanthine accumulation due to a reduction in the metabolic rate, as demonstrated in other studies (4). Indeed, we observed during ischemia, a significant fall in bile flows in hypothermic groups in comparison to normothermic groups, a finding compatible with a significant decrease in metabolic rate. Another possibility is related to the high antioxidant capacity of the hepatocytes. In a scenario of lower ROS release promoted by IPC or hypothermia, the antioxidant system could scavenge almost completely the ROS in liver tissue, as previously demonstrated (25).

One of the possible protective mechanisms of hypothermia is the decrease of the metabolic rate and oxygen demanding due to the reduction of temperature (3, 21, 26). However, some evidence shows that even a mild or moderate hypothermia is protective, a fact that challenges the concept that a decreased demand of oxygen is the only mechanism involved in the liver protection during hypothermia (3, 27, 28). In the present study, the analysis of bile flow, which is directly correlated to ATP synthesis, showed that during ischemia all groups presented an important decrease of bile flow. However, a significant bile flow reduction was seen in the hypothermic groups in comparison to normothermic groups during ischemia. This phenomenon

probably is related to the subsequent increase of bile flow after the reperfusion in the hypothermic groups, since bile flow returned to levels similar to the controls after 45 minutes of reperfusion, a finding not observed in normothermic groups. Moreover, a significant increase in bile flow was demonstrated after 105 minutes of reperfusion when hypothermic groups were compared to groups subjected to normothermic ischemia or normothermic ischemia and IPC. These findings show that local hypothermia was associated to an early recovery of the liver function. Bile flow has been considered a very sensitive parameter of the initial ischemia and reperfusion injuries and represents the residual function of the unaffected mass of hepatocytes, whereas other markers show only severe damage in a restricted number of hepatocytes (29, 30). In line with our study, Takahashi and coworkers showed that the reoxygenation in hypothermic animals is related to a total recovery of the energetic status, whereas animals subjected to normothermic ischemia did not present recovery of ATP synthesis (31). In contrast with previous reports (32), the application of isolated IPC had no improvement in bile flow after reperfusion, whereas the association of hypothermia and IPC showed a significant recovery, a finding that confirms the strong influence of the hypothermia in bile flow. Since the IPC benefits have been implicated also to a late window of protection, any possible late recovery of bile flow cannot be totally discarded.

Liver enzymes showed a high variability in ischemic groups. The NI and IPC groups presented a significant difference when compared to controls, whereas the H and IPC+H groups remained similar to controls. This finding suggests a protection promoted by topical hypothermia. Consistent with this, a negative correlation between liver transaminases and bile flow was found in the H group, a result which corroborates the influence of topical hypothermia in the present model.

In contrast to most authors (1, 8, 11, 32), IPC did not show benefits in liver injuries markers. This observation, however, is similar to other reports which used IPC in aged and cirrhotic rats, in liver donors to transplant or under total vascular exclusion (29, 33-35). A possible explanation might be related to the protocol of 90 minutes of ischemia applied in this study, which could be beyond the limits of IPC protection. Vajdovà and coworkers have suggested that the time of liver ischemia is important to IPC exerts its effects (36). Our observations, however, suggest that IPC allowed maintenance of the antioxidant capacity, which is in agreement with other studies (11, 37).

The current experimental model, in contrast to other techniques of hypothermia induction, was simple, safe and reliable. It has been suggested that maintenance of the temperature is the subject of extreme importance in experimental studies, since very low levels of transaminases have been reported without a clear demonstration of the animals body temperature, a fact that suggests that some studies could have been conducted under hypothermic conditions (3).

Histopathological analyses showed only mild injuries in all groups and both hypothermia and IPC failed to show significant improvement. The absence of severe morphological damage is consistent with the observations of other investigators that could not find substantial necrosis and apoptosis until later times of reperfusion (38).

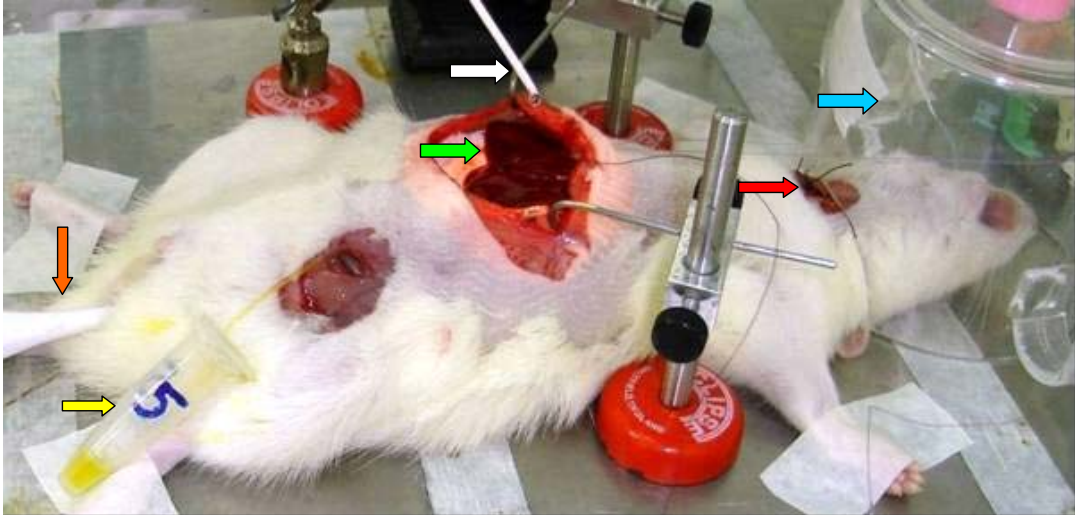
In summary, the induction of topical liver hypothermia at 26°C associated to IPC suggests a synergistic protective effect on hepatic lipid peroxidation. In addition, the induction of topical hypothermia isolated or associated to IPC attenuated liver injuries and allowed an early recovery of the liver function after reperfusion. These effects are probably related to a direct effect of hypothermia on ROS and ATP preservation.



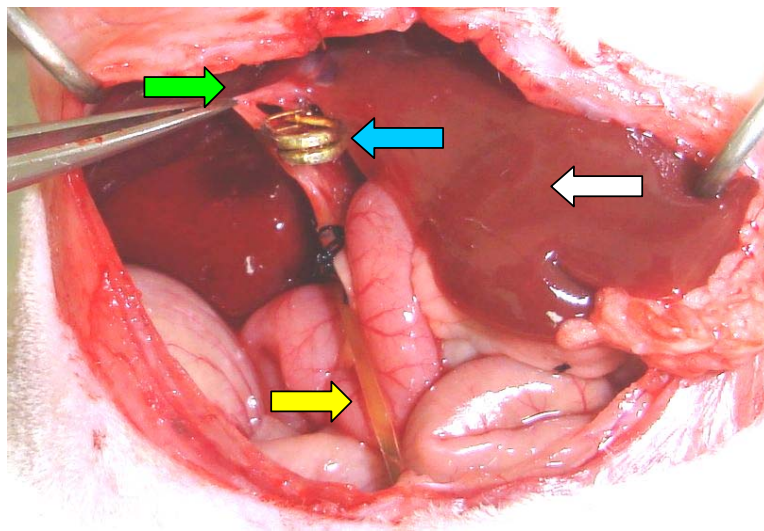
## Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the Animal Experimentation Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA for technical assistance, Professor Carlos Thadeu Cerski for his expertise in evaluating histopathological injuries and FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – HCPA) for its financial support.

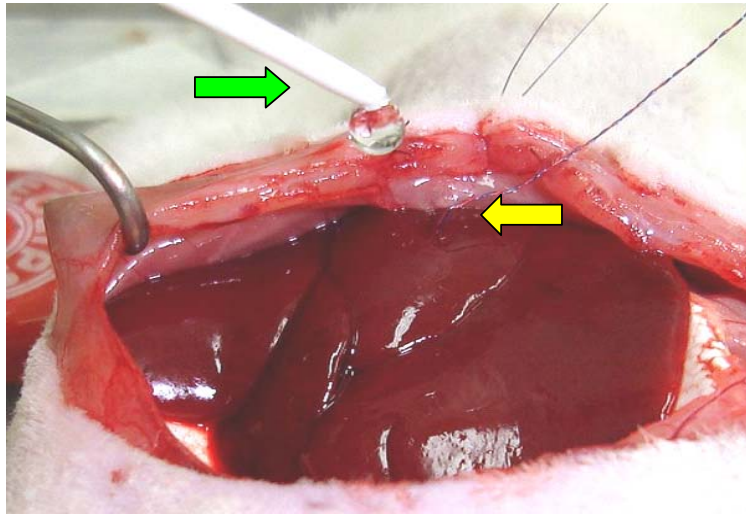
**Figures:**



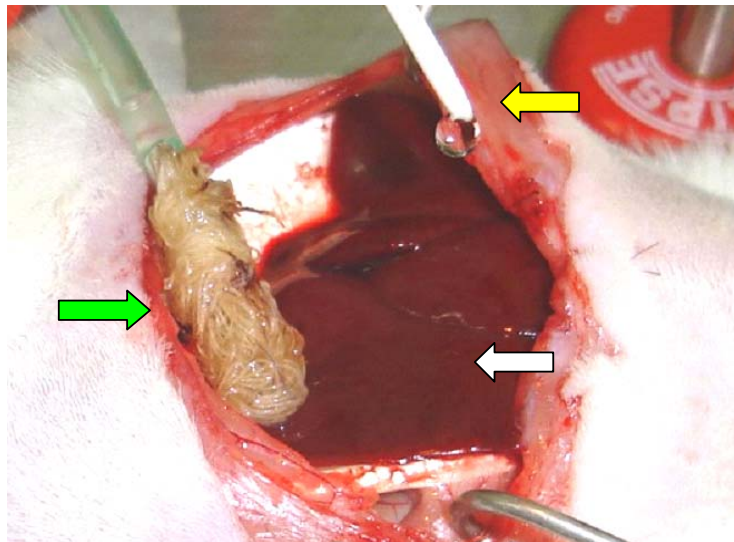
**Figure 1: Overall view of the experiment. Animal subjected to partial liver ischemia and topical hypothermia. Yellow arrow: bile flow collection. Orange arrow: rectal thermometer. White arrow: cold saline superfusion on the liver. Green arrow: ischemic liver lobes. Red arrow: carotid catheter. Blue arrow: oxygen by face mask.**



**Figure 2: Ischemia of the liver lobes. Green arrow: Bile ducts of the median and left lateral lobes not included in the cross-clamping. Yellow arrow: catheter introduced into the main bile duct. Blue arrow: microclip occluding the vascular pedicle to median and left lateral lobes. White arrow: ischemic left lateral lobe.**

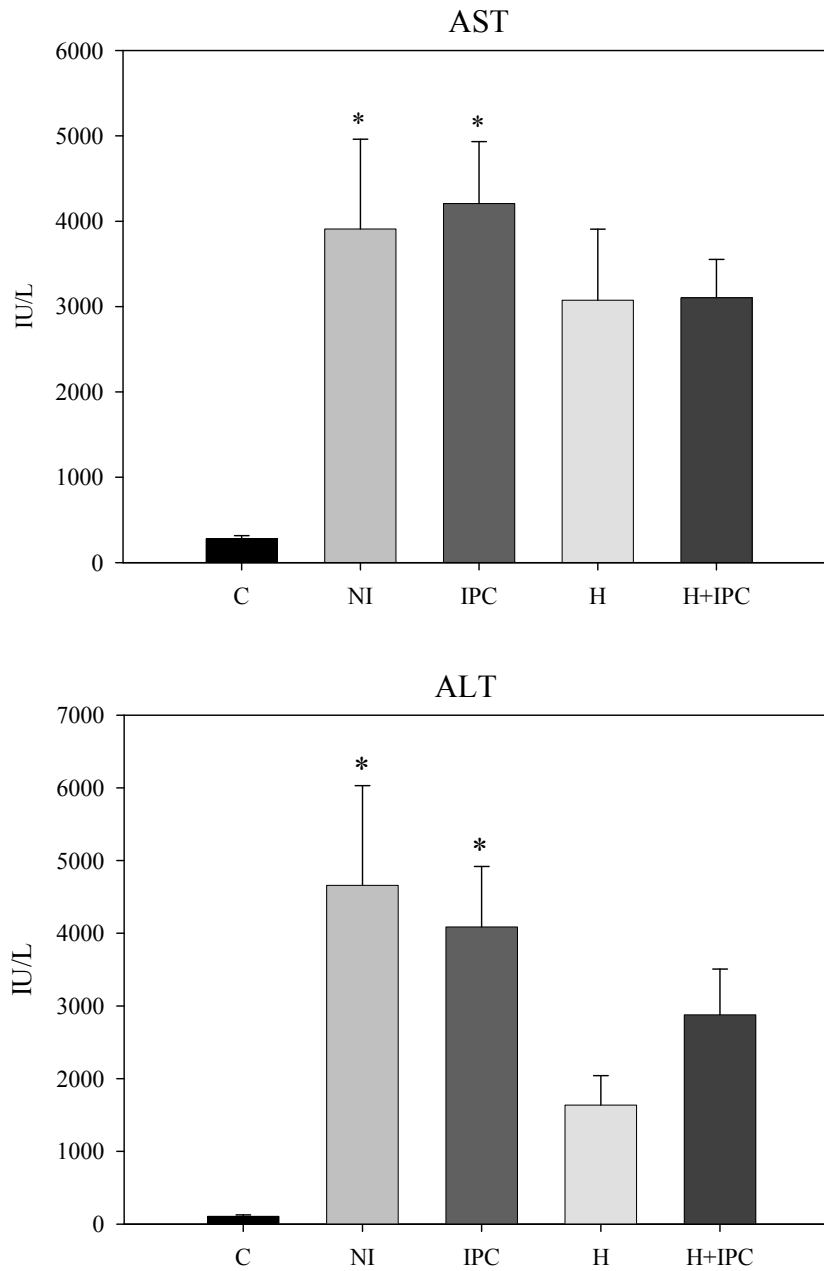


**Figure 3: Ischemic liver lobes placed into a concave shaped device. Green arrow: superfusion of saline on the liver lobes. Yellow arrow: intraparenchymal probe connected to a digital thermometer.**

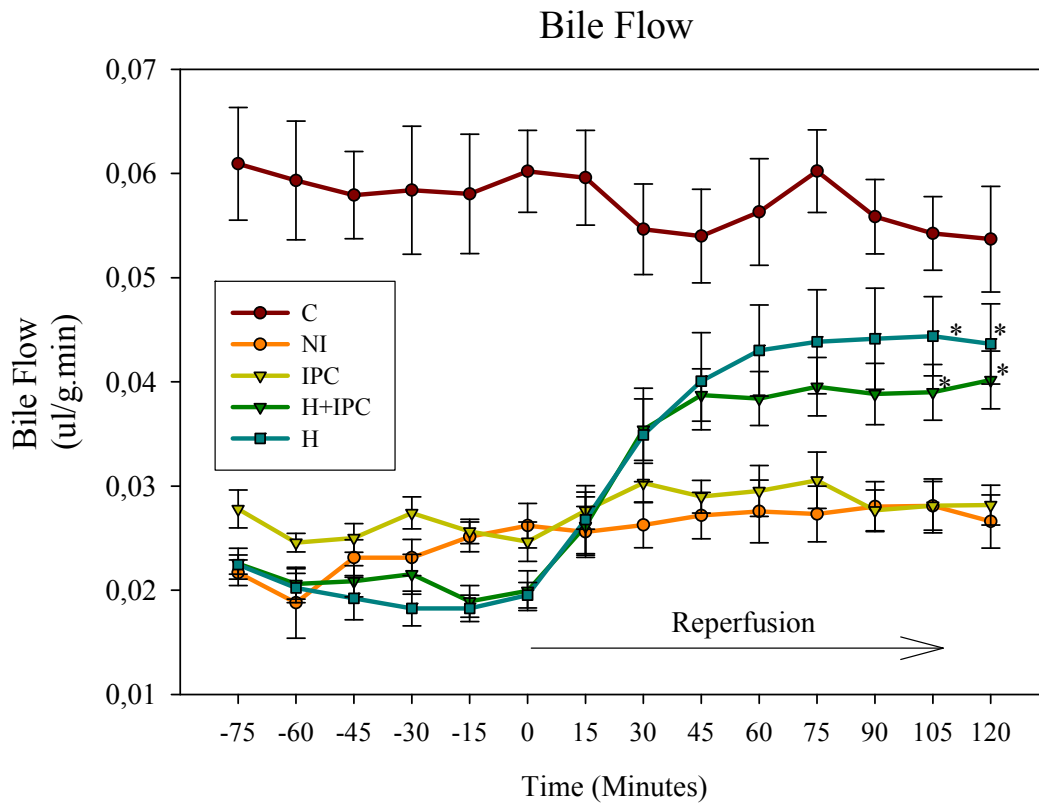


**Figure 4: Induction of topical liver hypothermia. Green arrow: Suction system. Yellow arrow: Cold saline superfusion on the ischemic liver lobes. White arrow: Ischemic liver lobes placed into a specially designed device.**

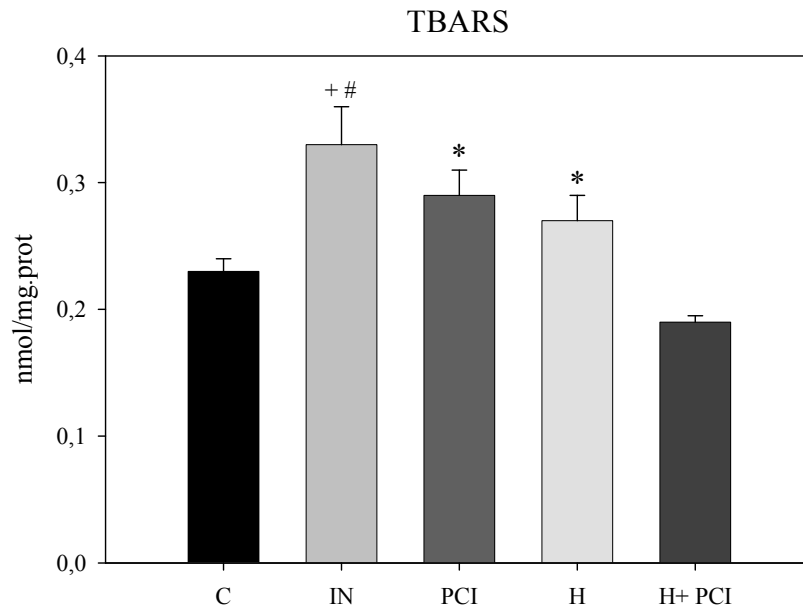
A)



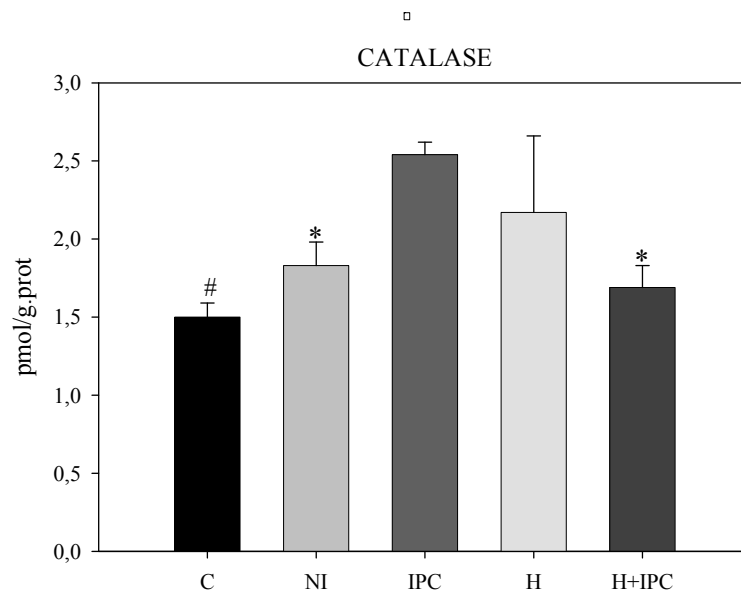
**Figure 5: (A) AST levels at the end of reperfusion. \* $P < 0.05$  vs. C. (B) ALT levels at the end of reperfusion. \* $P < 0.05$  vs. C. Data expressed as Mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Tukey post hoc test.**



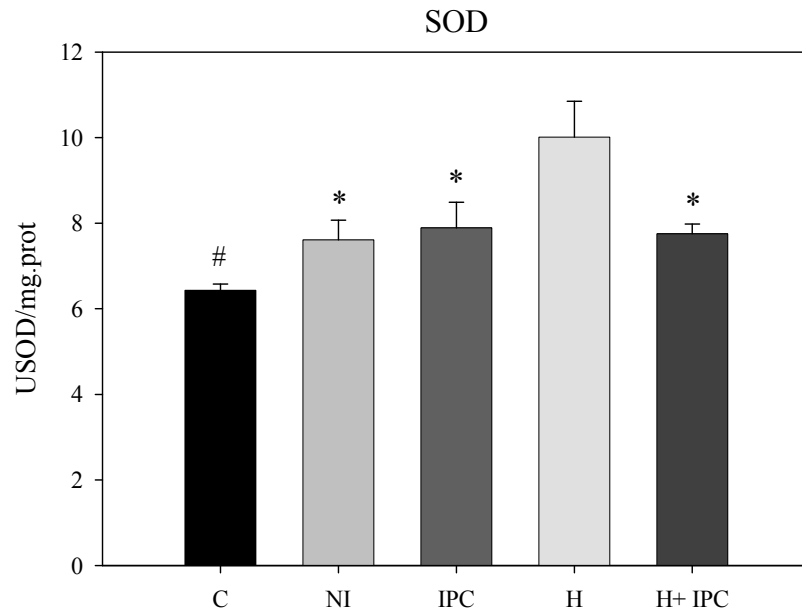
**Figure 6: Ischemia substantially reduces bile flow from the bilateral median and left lateral liver lobes. After reperfusion there was a recovery of bile flows in H+IPC and H groups (see the text). \*  $P < 0.05$  vs. NI and IPC. Data expressed as Mean  $\pm$  SEM, One-way ANOVA, Tukey post hoc test.**



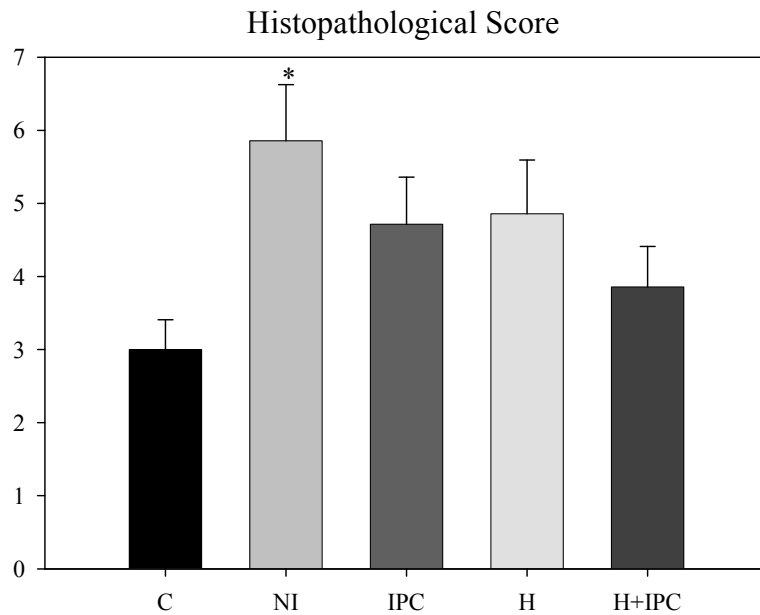
**Figure 7: TBARS levels at the end of reperfusion. <sup>+</sup>P<0.05 vs. C, \*P<0.05 vs. H+IPC, <sup>#</sup>P<0.01 vs. H+IPC. Data expressed as Mean ± SEM. ANOVA on ranks, Dunn post hoc test.**



**Figure 8: Catalase levels at the end of reperfusion. \*P<0.05 vs. IPC, <sup>#</sup>P<0.01 vs. IPC. Data are expressed as Mean ± SEM. One-way ANOVA, Student-Neumann-Keuls post hoc test.**



**Figure 9:** Superoxide dismutase levels at the end of reperfusion. # $P=0.01$  vs. H, \* $P<0.05$  vs. H. Data are expressed as Mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Student-Neuman-Keuls post hoc test.



**Figure 10:** Histopathological score injuries. HE sections were evaluated to the presence of hydropic degeneration (0-4), hepatocellular necrosis (0-4) and neutrophilic infiltrates (0-4). Data are presented as Mean  $\pm$  SEM. \* $P<0.05$  vs. C. One-way ANOVA, Tukey post hoc test.

## References:

1. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg*. 2003 Dec;238(6):843-50; discussion 51-2.
2. Yamanaka N, Yamanaka J, Tanaka T, Tanaka W, Yasui C, Ando T, et al. Topical cooling assisted hepatic resection of segment 7 and 8 oriented by en-bloc interruption of the targeted portal pedicles. *Hepatogastroenterology*. 1999 Jan-Feb;46(25):417-24.
3. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int*. 2006 Aug;26(6):734-41.
4. Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, et al. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2003 Oct 15;35(8):901-9.
5. Zar HA, Lancaster JR, Jr. Mild hypothermia protects against postischemic hepatic endothelial injury and decreases the formation of reactive oxygen species. *Redox Rep*. 2000;5(5):303-10.
6. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR, Jr. Mild therapeutic hypothermia for postischemic vasoconstriction in the perfused rat liver. *Anesthesiology*. 1999 Apr;90(4):1103-11.
7. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*. 1999 Jan;29(1):126-32.
8. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997 Apr;25(4):934-7.
9. Brooks G, Hearse DJ. Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: player or spectator? *Circ Res*. 1996 Sep;79(3):627-30.
10. Crenesse D, Laurens M, Gugenheim J, Heurteaux C, Cursio R, Rossi B, et al. Intermittent ischemia reduces warm hypoxia-reoxygenation-induced JNK(1)/SAPK(1) activation and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001 Nov;34(5):972-8.
11. Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA. Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol*. 2003 Dec;39(6):972-7.
12. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock*. 2005 Oct;24(4):370-5.



13. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)*. 2001 Jan;200(2):93-105.
14. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.
15. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1972 Jul;128(3):617-30.
16. Kirby TW, Fridovich I. A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*. 1982 Dec;127(2):435-40.
17. An J, Camara AK, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jun;288(6):H2620-7.
18. Lee YJ, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, et al. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 May;27(5):950-62.
19. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Apr;282(4):G608-16.
20. Imakita M, Yamanaka N, Kuroda N, Kitayama Y, Okamoto E. Does topical cooling alleviate ischemia/reperfusion injury during inflow occlusion in hepatectomy? Results of an experimental and clinical study. *Surg Today*. 2000;30(9):795-804.
21. Vejchapipat P, Poomsawat S, Poovorawan Y, Proctor E, Pierro A. The effects of moderate hypothermia on energy metabolism and serum inflammatory markers during laparotomy. *Pediatr Surg Int*. 2006 Jan;22(1):66-71.
22. Dinant S, van Veen SQ, Roseboom HJ, van Vliet AK, van Gulik TM. Liver protection by hypothermic perfusion at different temperatures during total vascular exclusion. *Liver Int*. 2006 May;26(4):486-93.
23. Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, van Gulik TM. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs. *Surgery*. 2003 Nov;134(5):806-17.
24. Shiratori Y, Kiriyaama H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci*. 1994 Jun;39(6):1265-72.
25. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol*. 2000 Mar;32(3):508-15.

26. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg*. 2000 Dec;191(6):650-6.
27. Niemann CU, Choi S, Behrends M, Hirose R, Noh J, Coatney JL, et al. Mild hypothermia protects obese rats from fulminant hepatic necrosis induced by ischemia-reperfusion. *Surgery*. 2006 Sep;140(3):404-12.
28. Vaquero J, Belanger M, James L, Herrero R, Desjardins P, Cote J, et al. Mild hypothermia attenuates liver injury and improves survival in mice with acetaminophen toxicity. *Gastroenterology*. 2007 Jan;132(1):372-83.
29. Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Dig Dis Sci*. 2007 May;52(5):1159-67.
30. Schiesser M, Wittert A, Nieuwenhuijs VB, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Intermittent Ischemia but Not Ischemic Preconditioning Is Effective in Restoring Bile Flow After Ischemia Reperfusion Injury in the Livers of Aged Rats. *J Surg Res*. 2008 Feb 1.
31. Takahashi K, Morikawa S, Inubushi T, Nosaka S. Protective effects of moderate hypothermia on phosphoenergetic metabolism in rat liver during gradual hypoxia studied by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Surg Res*. 2004 Apr;117(2):323-8.
32. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul;279(1):G163-71.
33. Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):1538-40.
34. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebah M, Ichai P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg*. 2006 Feb;202(2):203-11.
35. Pacheco EG, Gomes MC, Rodrigues GR, Campos W, Kemp R, Silva Ode C. Effect of liver ischemic preconditioning in cirrhotic rats submitted to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2006;21 Suppl 1:24-8.
36. Vajdová K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl*. 2004 Apr;10(4):520-8.
37. Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 28;11(12):1825-8.

38. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):917-36.

## 6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

HIPOTERMIA TÓPICA ASSOCIADA AO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO:  
DANOS HEPATOCELULARES, FUNÇÃO HEPÁTICA E DEFESAS ANTIOXIDANTES NA  
REPERFUSÃO INICIAL EM RATOS

Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho<sup>1</sup>, Tais Burmann de Mendonça<sup>2</sup>, Norma Anair Possa  
Marroni<sup>3</sup>, Cleber Dario Pinto Kruehl<sup>4</sup>, Carlos Otávio Corso<sup>5</sup>

**Estudo realizado na Unidade de Experimentação Animal, Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.**

<sup>1</sup> Mestre em Cirurgia, Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup> Acadêmica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> Fisiologista. Doutora em Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>4</sup> Professor Adjunto, Departamento de Cirurgia, Curso de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>5</sup> Professor Associado, Departamento de Ciências Morfológicas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

## Resumo

**Introdução/Objetivos:** A Hipotermia e o Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI) são técnicas capazes de reduzir os danos de isquemia e reperfusão em ressecções hepáticas. Os mecanismos não foram completamente elucidados e o uso combinado de ambas as técnicas não foi avaliado até o presente momento. **Material e Métodos:** Ratos foram submetidos à isquemia hepática parcial (70%) durante 90 minutos e 120 minutos de reperfusão. Cinco grupos foram estudados: Controle (C), Isquemia Normotérmica (IN), Pré-Condicionamento isquêmico (PCI), Hipotermia 26°C (H) e Hipotermia 26°C mais PCI (H+PCI). O PCI consistiu de 10 minutos de isquemia e reperfusão antes da isquemia prolongada e a hipotermia foi induzida por gotejamento de solução salina resfriada sobre os lobos isquêmicos. A pressão arterial média (PAM), a temperatura corporal e o fluxo biliar foram aferidos em intervalos de 15 minutos e os danos hepáticos, a peroxidação lipídica e as defesas antioxidantes foram avaliados 2 horas após a reperfusão. **Resultados:** A PAM e a temperatura corporal permaneceram constantes durante todo o experimento. O fluxo biliar retornou a valores semelhantes ao grupo C nos grupos H e H+PCI após 45 minutos de reperfusão e foi significativamente maior nos grupos H e H+PCI em comparação aos grupos IN e PCI após 105 minutos ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) e 120 minutos ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ). Os níveis plasmáticos da AST e ALT demonstraram aumento significativo nos grupos IN ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) e PCI ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) em comparação ao grupo C. Os níveis de TBARS foram significativamente menores no grupo H+PCI em comparação aos grupos IN ( $P<0,01$ ), PCI e H ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ). Os níveis de CAT foram significativamente maiores no grupo PCI em comparação aos grupos C ( $P<0,01$ ), IN e H+PCI ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ). Os níveis de SOD foram significativamente maiores no grupo H em comparação aos grupos C ( $P=0,01$ ), IN, PCI e H+PCI ( $P<0,05$ , respectivamente). **Conclusão:** A hipotermia tópica protegeu o fígado isquêmico contra

os danos de isquemia e reperfusão e permitiu uma recuperação precoce da função hepática possivelmente por uma atenuação do estresse oxidativo e preservação de ATP.

## Introdução

Os danos de isquemia e reperfusão (I/R) são uma causa importante de morbidade e mortalidade em cirurgias hepáticas e no transplante de fígado. Para atenuar os efeitos deletérios da I/R, estratégias como a Hipotermia Tópica e o PCI têm sido utilizadas com benefícios comprovados (1, 2).

O efeito protetor da hipotermia tem sido atribuído a uma redução no metabolismo e subsequente diminuição da demanda por oxigênio com a redução da temperatura. Além disso, a prevenção dos danos hepáticos promovidos por uma atenuação no estresse oxidativo também tem um papel importante (3, 4). Ao contrário da hipotermia aplicada através do resfriamento corporal ou resfriamento por perfusão *in situ*, a aplicação de hipotermia tópica é um método simples, rápido e de baixo custo, o qual não está associado com desequilíbrio hemodinâmico e redução da temperatura corporal. Existe crescente evidência que mesmo uma hipotermia leve a moderada produz proteção funcional contra os danos de I/R (4-6). Por outro lado, o PCI é um mecanismo endógeno potente através do qual episódios breves de I/R conferem um estado de proteção contra subsequentes períodos prolongados de isquemia. Embora alguns mediadores, tais como a adenosina (7), o óxido nítrico (8) e várias kinases (9-11) tenham sido identificados, o mecanismo que dispara o efeito protetor permanece desconhecido. Um dos possíveis mecanismos protetores está relacionado a uma atenuação no estresse oxidativo (12). Neste estudo, os autores avaliaram a ocorrência de efeitos protetores sinérgicos com a associação de ambas as técnicas e analisaram

os danos hepatocelulares, a função hepática e as defesas antioxidantes na fase inicial de reperfusão do órgão.

## Material e Métodos

### *Animais*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética em Pesquisa vinculado ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA-UFRGS, o qual segue as normas do Conselho Internacional das Ciências Médicas (CIOMS). Ratos Wistar machos pesando entre 200-250g foram utilizados em todos os experimentos. Os animais foram alimentados com dieta padronizada de água e ração *ad libitum* até a noite anterior ao experimento e foram conservados sob condições ambientais constantes com ciclos de noite-vigília de 12 horas.

### *Anestesia e procedimentos cirúrgicos*

Os animais foram anestesiados com Sulfato de Ketamina 75 mg/kg (Dopalen, Vetbrands, Jacareí, Brazil) e Xilazina 10 mg/kg (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, Brazil) por via intraperitoneal. Suplementos de um terço da dose foram administrados quando necessário. Os animais foram colocados em posição supina sobre uma mesa cirúrgica aquecida para a manutenção da temperatura corporal. A temperatura retal foi medida em intervalos de 15 minutos através de um termômetro digital e foi ajustada em 35,5°C – 37,5°C quando necessário com o auxílio de uma lâmpada. Um cateter de polietileno (Portex PE-50, Hythe, Kent, Reino Unido) foi inserido na carótida direita para mensuração da PAM (Sirecust 304D Siemens, Munique, Alemanha) a cada 15 minutos e infusão contínua de cloreto de sódio a 0,9% (2 ml/h). Oxigênio a 0,5 l/min foi administrado por uma campânula (Figura 1). O fígado foi exposto através de uma

incisão transversa, afastadores foram posicionados nos arcabouços costais e o fígado foi liberado de seus ligamentos. O ducto biliar principal foi canulado (Portex PE-50, Hythe, Kent, Reino Unido) e os volumes de bile mensurados em intervalos de 15 minutos por sifonagem. Para induzir hipotermia hepática, o suprimento sanguíneo para os lobos mediano e lateral esquerdo foi interrompido pela aplicação de um clipe microvascular atraumático (Medicon, Tuttlingen, Alemanha) ao nível da artéria hepática e veia porta, sem incluir as vias biliares (Figura 2). Os lobos direito e caudado permaneceram sem interrupção do fluxo sanguíneo e permitiram o fluxo de saída da circulação esplâncnica, evitando congestão venosa. Durante a isquemia, a cabeceira da mesa cirúrgica foi elevada em aproximadamente 30 graus e os lobos mediano e lateral esquerdo foram mobilizados cuidadosamente dentro de um dispositivo de polietileno, confeccionado para isolar os lobos isquêmicos na cavidade abdominal, semelhante ao previamente descrito por outros autores (13). Uma haste flexível (IT-23, 0.5mm, Braintree Scientifics, Boston, USA) conectada a um termômetro digital (Thermalert - TH5, Braintree Scientifics, Boston, USA) foi introduzida na região central dos lobos isquêmicos e a temperatura ajustada a 26°C pela superfusão de solução salina fisiológica resfriada nos grupos H e H+PCI (Figura 3). Para evitar o derramamento de solução resfriada na cavidade abdominal e conseqüente resfriamento do animal, um sistema de aspiração foi instalado para remover o excesso de líquidos (Figura 4). O PCI consistiu de 10 minutos de isquemia normotérmica e 10 minutos de reperfusão antes da isquemia prolongada somente nos grupos PCI e H+PCI. Após 90 minutos de isquemia, o clipe foi removido e o fígado reperfundido por 120 minutos. Ao término do experimento o animal foi exsangüinado e amostras de sangue foram obtidas. Após, o fígado foi pesado e um segmento dos lobos previamente isquêmicos foi cortado em cubos, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e conservado em um refrigerador a - 80°C, enquanto que outro fragmento foi fixado em formaldeído a 4%.



## *Delineamento Experimental*

### *1. Grupo Controle (C)*

Os animais foram submetidos a laparotomia e toda a preparação, permanecendo sem isquemia durante todo o procedimento (n=4).

### *2. Grupo Isquemia Normotérmica (IN)*

Os fígados foram submetidos à isquemia dos lobos mediano e lateral esquerdo por 90 minutos e subsequente reperfusão por 120 minutos (n=7).

### *3. Grupo Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI)*

O PCI consistiu de 10 minutos de isquemia normotérmica e 10 minutos de reperfusão. Após, os lobos hepáticos pré-condicionados foram expostos a 90 minutos de isquemia seguidos por 120 minutos de reperfusão (n= 7).

### *4. Grupo Hipotermia (H)*

Imediatamente após a isquemia iniciar, os lobos mediano e lateral esquerdo foram resfriados até atingir 26°C durante 90 minutos. Após, os fígados foram reperfundidos durante 120 minutos em normotermia (n=7).

### *5. Grupo Hipotermia mais Pré-Condicionamento Isquêmico (H+PCI)*

O PCI consistiu de 10 minutos de isquemia normotérmica e 10 minutos de reperfusão. Imediatamente após a isquemia iniciar, os lobos mediano e lateral esquerdo foram resfriados até atingir a temperatura de 26°C durante 90 minutos. Após, os fígados foram reperfundidos durante 120 minutos em normotermia. (n=7).

## *Fluxo Biliar*

Amostras de bile foram coletadas em intervalos de 15 minutos por sifonagem. O volume de bile foi determinado gravimetricamente, assumindo a densidade de 1.0 g/ml. Os resultados foram expressos como microlitros por minuto por grama de peso.

#### *Enzimas Hepáticas*

Amostras sangüíneas foram retiradas da artéria carótida ao término do experimento e imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 4000rpm. O plasma obtido foi estocado a -80°C. As atividades da Aspartato Aminotransferase (AST) e da Alanina Aminotransferase (ALT) foram mensuradas por um analisador automatizado (Modular P800 Hitachi, Roche-Boehringer, Mannheim, Alemanha).

#### *TBARS*

As medidas dos níveis de TBARS foram determinadas pelo método de Buege e Aust (14). O fígado foi homogeneizado com ácido tricloroacético a 10% e com uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0.67% mais sulfato de sódio a 7.1%. Após, o composto foi aquecido a 100°C durante 30 minutos e posteriormente resfriado em gelo durante 10 minutos. Em seguida, álcool n-butílico foi adicionado ao composto, que foi agitado por 30 segundos em um sistema Vortex e centrifugado durante 5 minutos. O supernadante obtido, o qual é produto da reação de lipoperóxidos foi transferido a uma placa para leitura em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 535nm. Os resultados foram expressos em nanomoles por miligrama de proteína (nmol/mg.prot).

#### *Catalase*

A atividade da Catalase foi avaliada de acordo com o método descrito por Boveris e Chance (15). Ao homogenado do fígado foram adicionados tampão fosfato 50 mM (ph 7.0) e

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A taxa de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 M) adicionado ao composto foi determinada por leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em picomoles por miligrama de proteína (pmoles/mg.prot)

### *SOD*

A atividade da enzima antioxidante Catalase foi avaliada através da técnica descrita por Fridovich (16). Em uma placa de 96 recipientes foram adicionados ao homogenado hepático um tampão de glicina 50 mM (pH 11.0) e adrenalina. A capacidade da SOD de inibir a reação do radical livre superóxido foi determinada por leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 480 nm. Os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (USOD/mg.prot).

### *Histologia Hepática*

Um patologista avaliou os cortes em HE sem conhecer a que grupo pertencia cada amostra, procurando por três parâmetros de danos histopatológicos. Foram avaliados as presenças de degeneração hidrópica, necrose hepatocelular e infiltrados neutrofilicos. Todos variaram de um escore de 0 a 4. A soma dos parâmetros de danos histopatológicos foi calculada para cada espécime e os escores apresentados como médias em cada grupo.

### *Análise Estatística*

Os dados foram analisados para significância estatística com análise da variância (ANOVA ou Kruskal-Wallis) e testes de múltiplas comparações (Tukey, Student-Neuman-Keuls, Dunn) utilizando um pacote estatístico (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Alemanha). As correlações entre os níveis de AST e ALT com o fluxo biliar e os níveis de

TBARS foram realizadas através do índice de Spearman. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da média (EP). Os valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significantes.

## Resultados

### *Parâmetros Hemodinâmicos e Temperatura Corporal*

A PAM e a temperatura corporal permaneceram constantes em todos os grupos durante todo o experimento. Não houve diferença significativa entre os animais submetidos à hipotermia tópica, isquemia normotérmica e o grupo controle.

As médias da PAM variaram entre  $76,5 \pm 3,1$  mmHg a  $83,8 \pm 1,8$  mmHg no grupo C,  $83,3 \pm 4,5$  mmHg a  $101,0 \pm 5,8$  mmHg no grupo IN,  $86,3 \pm 3,2$  mmHg a  $97,9 \pm 6,1$  mmHg no grupo PCI,  $84,7 \pm 5,0$  mmHg a  $97,3 \pm 6,7$  mmHg no grupo H e  $82,6 \pm 4,4$  mmHg a  $94,7 \pm 4,2$  mmHg no grupo H+PCI.

As médias dos extremos da temperatura corporal variaram entre  $36,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  a  $37,0 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  no grupo C,  $36,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  a  $37,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  no grupo IN,  $36,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  a  $37,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  no grupo PCI,  $35,8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  a  $37,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  no grupo H e  $36,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  a  $37,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  no grupo H+PCI.

### *Enzimas Hepáticas*

#### *AST*

Ao término da reperfusão, os níveis médios da AST no grupo C foram de  $279 \pm 36$  UI/L, enquanto que no grupo IN aumentaram significativamente para  $3910 \pm 1049$  UI/L ( $P < 0,05$  vs. C). Como no grupo IN, os níveis médios da AST no grupo PCI aumentaram significativamente para

4207±725 UI/L ( $P<0,05$  vs. C). No grupo H os níveis médios foram de 3074±832 UI/L, enquanto que no grupo H+PCI foram de 3101±450 UI/L (Figura 5).

#### *ALT*

Ao término da reperfusão, os níveis médios da ALT no grupo C foram de 107±40 UI/L, enquanto que no grupo IN aumentaram significativamente para 4660±1371 UI/L, ( $P<0,05$  vs. C). Como no grupo IN, os níveis médios da ALT no grupo PCI aumentaram significativamente para 4086±832 UI/L ( $P<0,05$  vs. C). No grupo H os níveis médios de ALT foram de 1637±404 UI/L, enquanto que no grupo H+PCI foram de 2878±629 UI/L (Figura 5).

#### *Fluxo Biliar*

O clampeamento do fluxo portal reduziu a taxa do fluxo biliar em todos os grupos em comparação ao grupo C. Durante os 90 minutos de isquemia o fluxo biliar total nos grupos IN e PCI foi significativamente maior em comparação aos grupos H e H+PCI (Tabela 1).

**Tabela 2a: Fluxo biliar durante a isquemia ( $\mu\text{l/g}\cdot\text{min}$ )**

| <i>Grupo</i> | <i>Média</i>          | <i>EP</i> |
|--------------|-----------------------|-----------|
| C            | 0,0591*               | 0,0039    |
| IN           | 0,0230 <sup># +</sup> | 0,0054    |
| PCI          | 0,0259 <sup>†</sup>   | 0,0044    |
| H            | 0,0197                | 0,0052    |
| H+PCI        | 0,0207                | 0,0041    |

\* $P<0,01$  vs. todos grupos. <sup>#</sup>  $P=0,01$  vs. H+PCI, <sup>+</sup> $P<0,05$  vs. H.  
<sup>†</sup> $P<0,01$  vs. H+PCI e H. Dados expressos como Médias  $\pm$  EP. One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações.

Ao término da reperfusão, o fluxo biliar nos grupos H e H+PCI retornou a níveis similares aos controles após 45 minutos de reperfusão e foi significativamente maior que o fluxo biliar nos grupos IN e PCI após 105 minutos ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) e 120 minutos ( $P<0,05$  e  $P<0,05$ ) (Figura 6).

#### *TBARS, Catalase e SOD*

No final do experimento, a peroxidação lipídica e as defesas antioxidantes foram avaliadas no tecido hepático. Os níveis de TBARS demonstraram diferença significativa com os outros grupos que realizaram tratamentos, mas não em relação aos controles (Figura 7). A atividade da enzima antioxidante Catalase foi determinada no tecido hepático ao término da reperfusão. Uma atividade significativamente maior foi observada no grupo PCI quando comparada aos grupos C, IN e H+PCI (Figura 8). Em contraste, os níveis de SOD demonstraram um aumento significativo no grupo H em comparação a todos os outros grupos (Figura 9).

#### *Correlações*

No grupo H foi observada uma correlação negativa entre a AST e ALT com o fluxo biliar ( $r = -0,88$ ,  $P<0,05$  e  $r = -0,087$ ,  $P<0,01$ , respectivamente), enquanto uma correlação positiva foi observada entre a AST e ALT com os níveis de TBARS ( $r = 0,92$ ,  $P<0,01$  e  $r = 0,78$ ,  $P<0,05$ , respectivamente).

#### *Escore Histopatológico*

As médias dos escores em cada grupo são apresentadas na (Figura 10). Uma diferença significativa foi observada no grupo IN ( $P<0,05$ ) em comparação ao grupo C.

No presente estudo, um modelo que associa duas importantes ferramentas de proteção contra os danos de isquemia e reperfusão foi avaliado. Até o conhecimento dos autores, este é o primeiro relato do uso simultâneo destas técnicas, enquanto que esta combinação já foi avaliada em cirurgias cerebrais e cardíacas (17, 18). Os mecanismos protetores da hipotermia e do PCI não estão completamente elucidados, mas a atenuação dos danos provocados pelos radicais livres de oxigênio (RLO) formados após a reperfusão parece ser, pelo menos em parte, um mecanismo protetor de ambas as técnicas (6, 12). Outros autores também têm demonstrado que o estresse oxidativo depende da temperatura intra-isquêmica e que a hipotermia atenua a resposta inflamatória mesmo com uma pequena redução na temperatura, possivelmente por uma redução no recrutamento de neutrófilos e prevenção do fenômeno de falha de perfusão (“*No reflow*”) (3, 4, 19). Em concordância com Kato e colaboradores, nós observamos que a indução de hipotermia permite uma perfusão macroscópica homogênea dos lobos isquêmicos após a reperfusão, enquanto nos grupos normotérmicos foram observadas diversas áreas de perfusão heterogênea. Este achado macroscópico possivelmente está relacionado a uma atenuação do fenômeno de “*No reflow*” pela hipotermia, um efeito também observado por outros autores em diferentes temperaturas (13).

As principais técnicas de hipotermia são o Resfriamento Corporal Total e a Perfusão Hipotérmica *in situ*. A primeira técnica não tem sido aceita em virtude do risco de arritmias e acidose metabólica, enquanto a segunda é restrita a situações especiais devido à complexidade de execução (20, 21). Contudo, os achados demonstram que a indução de hipotermia tópica a 26°C não provocou distúrbios hemodinâmicos durante os experimentos e os níveis de temperatura foram similares em todos os grupos. Assim, qualquer possível influência da PAM e da temperatura nos resultados obtidos pode ser descartada. Em concordância com estes achados, outros relatos demonstraram que a hipotermia tópica é segura e não tem influência na

hemodinâmica e temperatura dos animais (3, 4, 22, 23). De acordo com Yamanaka e colaboradores, o uso da hipotermia tópica poderia oferecer benefícios em qualquer ressecção onde se realiza interrupção do fluxo sanguíneo aferente (2).

Neste estudo foi observada uma diminuição significativa nos níveis de TBARS e, portanto, na peroxidação lipídica das membranas celulares no grupo H+PCI quando comparado com os outros grupos que receberam tratamentos. Assim, os achados sugerem que, neste modelo, um efeito sinérgico com a combinação da hipotermia e PCI foi obtido na prevenção dos danos provocados pelos RLO. Este achado demonstra que tanto a hipotermia quanto o PCI parecem ter uma profunda influência nos danos causados pelos RLO (5, 13). Esta proteção, no caso da hipotermia foi relacionada a uma significativa preservação da atividade da SOD. A associação da hipotermia com o PCI, contudo, atenuou a preservação dos níveis de SOD. Uma possível explicação está provavelmente relacionada a uma menor liberação do anion superóxido pelas células de Kupffer e mitocôndrias (24) quando a hipotermia é aplicada, enquanto que o PCI é incapaz de influenciar nesta liberação. Por outro lado, o PCI parece ter influência na liberação de peróxido de hidrogênio, uma vez que o PCI promoveu significativa preservação dos níveis da Catalase tecidual. A hipotermia, em contraste, atenuou esta resposta protetora do PCI. Assim a hipotermia e o PCI parecem agir de modos diferentes sobre o sistema antioxidante hepático. Possíveis explicações para a menor atividade da Catalase no grupo hipotérmico poderiam estar relacionadas a uma diminuição na hidrólise do AMP e menor acúmulo de hipoxantina devido à redução da taxa metabólica, como já demonstrado por outros autores (4). De fato, durante a isquemia, a hipotermia provocou uma redução significativa nos fluxos biliares em comparação aos grupos normotérmicos, compatível com uma importante redução na taxa metabólica. Outra possibilidade é que a alta capacidade antioxidante dos hepatócitos associada a uma menor



liberação de RLO promovida pelo PCI e pela hipotermia poderia ser suficiente para detoxificar quase que completamente os RLO no tecido hepático (25).

Um dos possíveis mecanismos associados com a indução de hipotermia é uma redução no metabolismo e demanda de oxigênio com a redução das temperaturas (3, 21, 26). Contudo, várias evidências têm demonstrado que mesmo uma hipotermia leve ou moderada é protetora, um fato que desafia o conceito que a redução na demanda de oxigênio é o único mecanismo envolvido na proteção conferida pela hipotermia (3, 27, 28). No presente estudo, a análise do fluxo biliar, o qual está diretamente correlacionado com a síntese de ATP, demonstrou que durante a isquemia todos os grupos apresentaram uma importante redução nos fluxos biliares. Entretanto, uma redução significativa nos grupos hipotérmicos foi observada em comparação com os grupos normotérmicos. Este fenômeno foi diretamente relacionado à recuperação do fluxo biliar após a reperfusão, já que os grupos hipotérmicos demonstraram uma recuperação do débito biliar a níveis similares aos do grupo controle depois de transcorridos 45 minutos de reperfusão. Mais, uma diferença significativa com os grupos normotérmicos foi observada após 105 e 120 minutos de reperfusão. Estes achados mostram claramente que a hipotermia tópica esteve associada a uma recuperação precoce da função hepática. Como previamente demonstrado, o fluxo biliar tem sido considerado como um marcador sensível dos danos de isquemia e reperfusão, uma vez que representa a função residual de uma grande massa de hepatócitos após o insulto isquêmico, enquanto que outros marcadores representam danos graves a um número restrito de hepatócitos (29, 30). Em linha com os achados de recuperação do fluxo biliar, Takahashy e colaboradores demonstraram que a restauração da oxigenação em animais hipotérmicos está associada a uma recuperação total do status energético, enquanto que animais submetidos à isquemia em normotermia não apresentam recuperação da síntese de ATP (31). Em contraste com relatos prévios (32), a aplicação de PCI no presente estudo não provocou melhora no fluxo biliar após a

reperusão. Entretanto, a associação de H+PCI obteve benefícios, um achado provavelmente não relacionado ao PCI, mas com forte influência da hipotermia. Já que os benefícios do PCI têm sido implicados também a uma janela de proteção tardia, uma possível recuperação nos fluxos biliares não pode ser totalmente descartada.

As transaminases hepáticas demonstraram uma alta variabilidade nos grupos isquêmicos. Os grupos normotérmicos apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle, mas o mesmo não foi observado nos grupos hipotérmicos, um achado sugestivo de proteção promovida pela hipotermia tópica. Consistente com estes achados, uma correlação negativa entre as transaminases e o fluxo biliar foi encontrada no grupo H, o que corrobora os benefícios da hipotermia tópica no presente modelo.

Em contraste com muitos autores (1, 8, 11, 32), o PCI não mostrou benefícios nos marcadores de lesão hepática. Esta observação, contudo, é similar aos achados de outros que utilizaram PCI em ratos velhos, em doadores de fígado para transplante, em ratos cirróticos ou sob exclusão vascular total (30, 33-35). Uma possível explicação é que os 90 minutos de isquemia aplicados neste estudo poderiam estar além dos limites da proteção conferida pelo PCI. Vajdová e colaboradores têm sugerido que o tempo de isquemia é importante para que o PCI exerça seu efeito (36). As observações, entretanto, sugerem que o PCI permite manutenção da capacidade antioxidante, um achado semelhante a outras observações (37).

O uso do presente modelo experimental, em contraste com outras técnicas de indução de hipotermia, foi seguro e confiável. Alguns autores têm sugerido que a manutenção da temperatura é fundamental em estudos experimentais, já que muitos investigadores têm relatado níveis muito baixos de transaminases sem uma clara demonstração da temperatura dos animais, um fato que sugere que estes estudos podem ter sido conduzidos em condições hipotérmicas (3).

A análise histopatológica demonstrou apenas lesões leves em todos os grupos e tanto a hipotermia quanto o PCI não demonstraram melhora significativa. A ausência de danos morfológicos graves é consistente com as observações de outros autores, que não encontraram necrose e apoptose substanciais até as fases tardias da reperfusão (38).

Em resumo, a utilização de hipotermia hepática tópica a 26°C associada ao PCI promoveu um efeito protetor sinérgico sobre a peroxidação lipídica hepática. Além disso, a indução de hipotermia tópica isoladamente ou em associação com o PCI atenuou os danos hepatocelulares e permitiu uma recuperação precoce da função hepática após a reperfusão, um mecanismo provavelmente relacionado a um efeito da hipotermia sobre o estresse oxidativo e preservação de ATP.

## Agradecimentos

Os autores agradecem os profissionais da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA pela assistência técnica, ao Professor Carlos Thadeu Cerski pela avaliação dos danos histopatológicos e ao FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos –HCPA) pelo auxílio financeiro.

## Figuras:

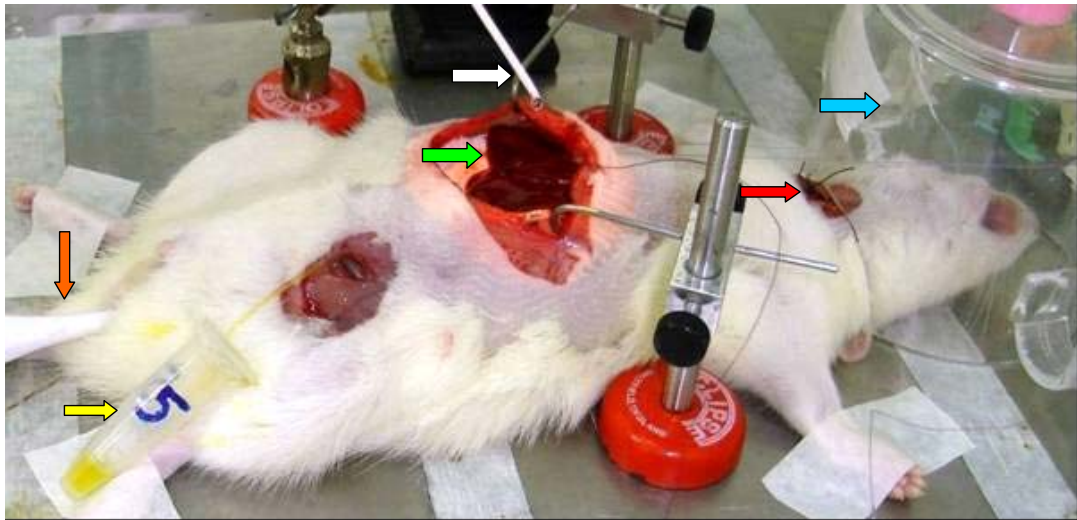


Figura 1.: Visão geral do experimento. Animal submetido a isquemia parcial do fígado e hipotermia tópica. Seta amarela: coleta de bile. Seta laranja: termômetro retal. Seta branca: gotejamento de solução fisiológica sobre o fígado. Seta verde: lobos hepáticos isquêmicos. Seta vermelha: cateter carotídeo. Seta azul: oxigênio por máscara facial.

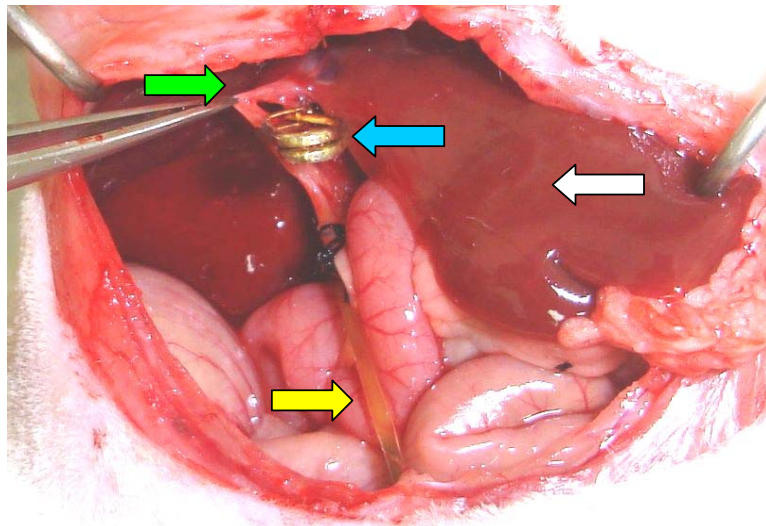
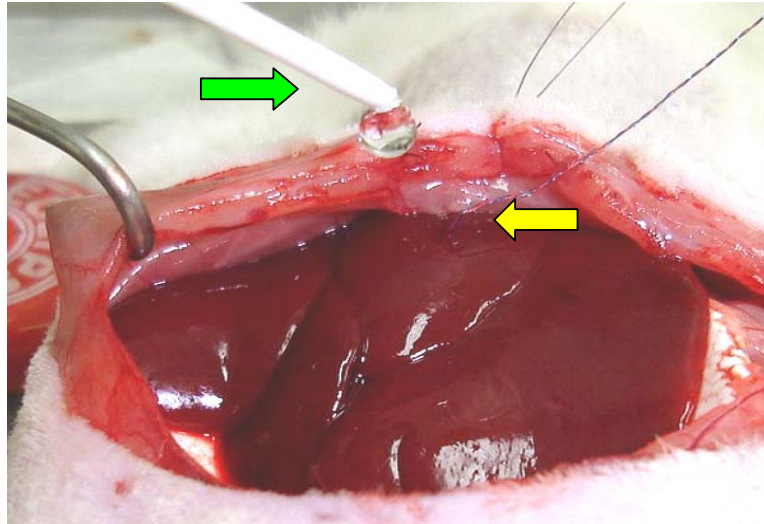
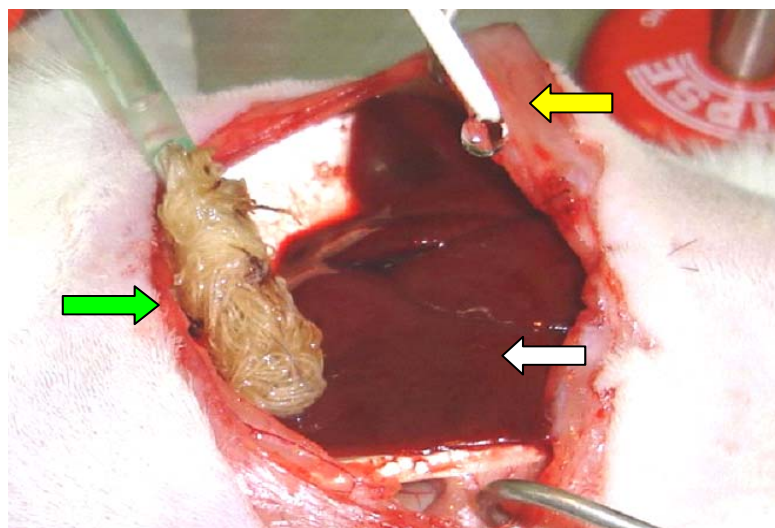


Figura 2: Isquemia dos lobos hepáticos. Seta verde: Ductos biliares dos lobos mediano e lateral esquerdo não incluídos no clampeamento. Seta amarela: cateter introduzido no ducto biliar principal. Seta azul: microclipe interrompendo o fluxo sanguíneo do pedículo vascular para os lobos mediano e lateral esquerdo. Seta branca: lobo lateral esquerdo isquêmico.

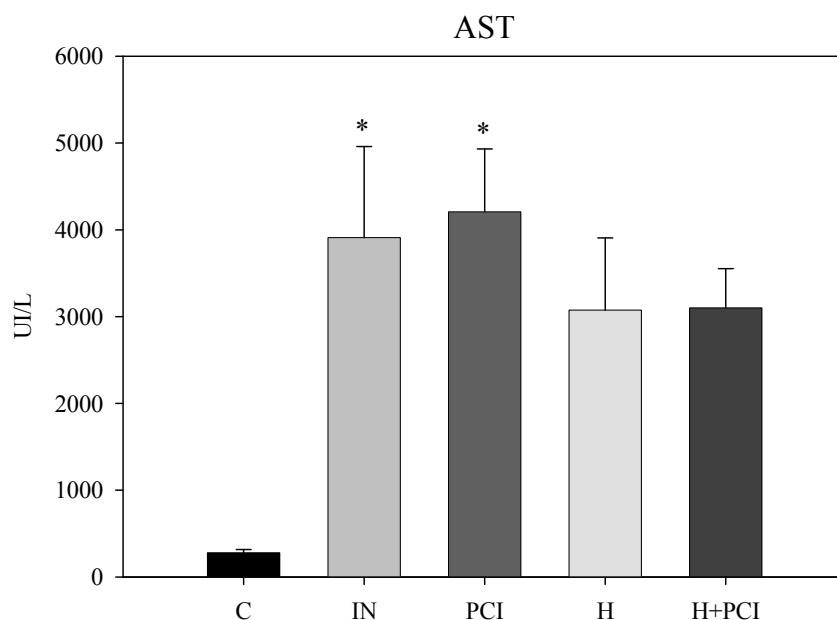


**Figura 3: Lobos hepáticos isquêmicos posicionados dentro de um dispositivo côncavo. Seta verde: gotejamento de solução fisiológica sobre os lobos isquêmicos. Seta amarela: probe intraparenquimatoso conectado ao termômetro digital.**

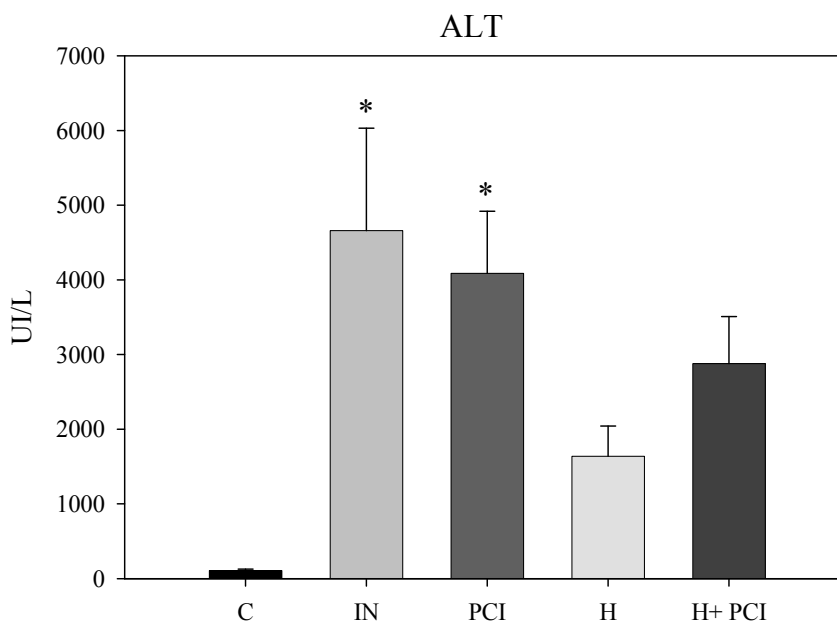


**Figura 4: Indução de hipotermia hepática tópica. Seta verde: Sistema de aspiração. Seta amarela: Gotejamento de solução fisiológica gelada sobre os lobos hepáticos isquêmicos. Seta branca: Lobos hepáticos posicionados dentro de dispositivo especialmente confeccionado.**

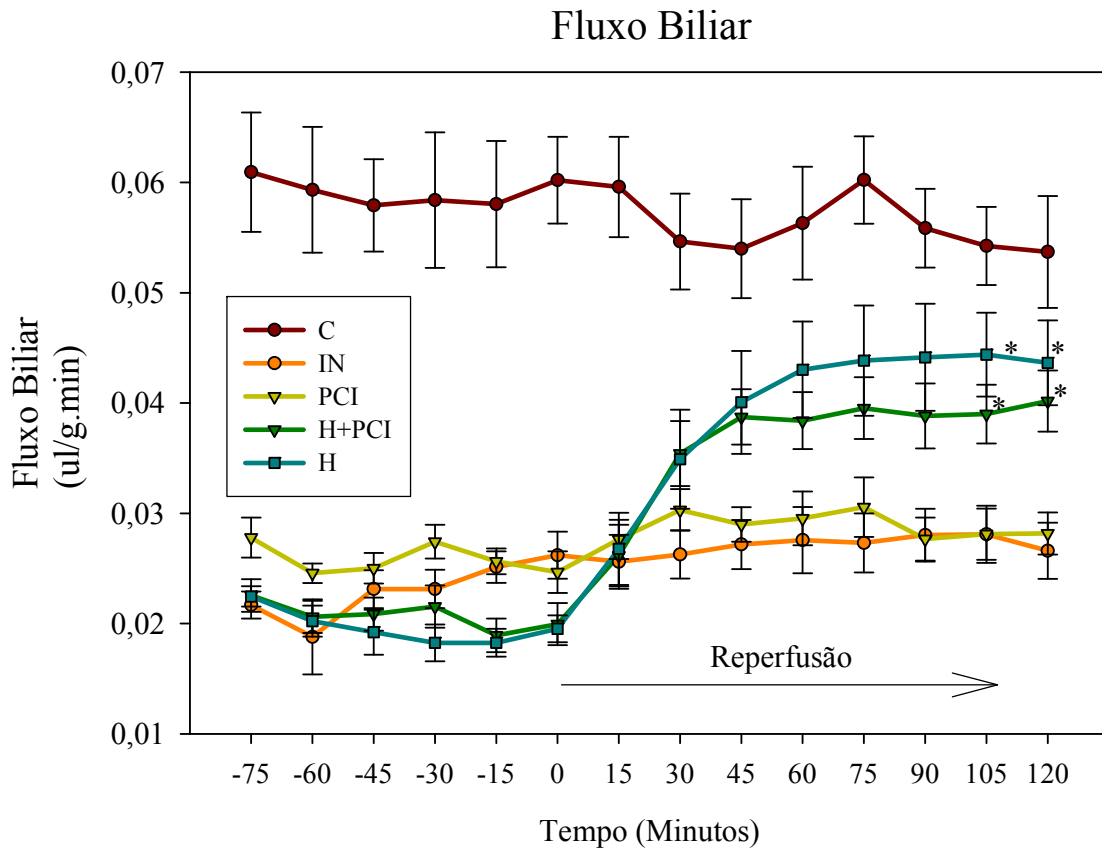
A)



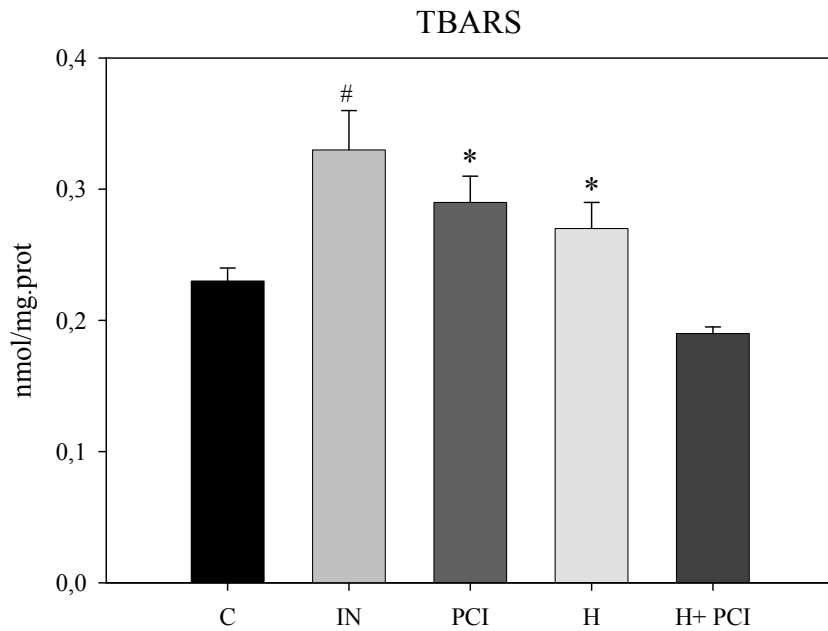
B)



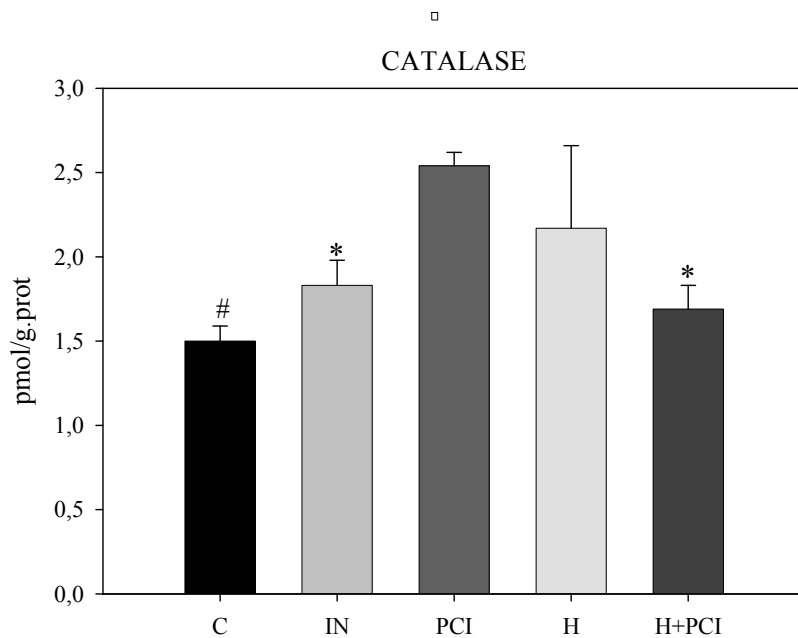
**Figura 5: Atividade da AST ao término da reperfusão. \* $P < 0,05$  vs. IN e  $P < 0,05$  vs. PCI. (B) Atividade da ALT ao término da reperfusão. \* $P < 0,05$  vs. IN e  $P < 0,05$  vs. PCI. Dados expressos como Médias  $\pm$  EP. One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações.**



**Figura 6:** A isquemia reduziu substancialmente o fluxo biliar dos lobos mediano e lateral esquerdo. Após a reperfunção houve recuperação do fluxo biliar nos grupos H e H+PCI (veja o texto). \*  $P < 0,05$  vs. IN e PCI, respectivamente. Dados expressos como Média  $\pm$  EP. One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações.

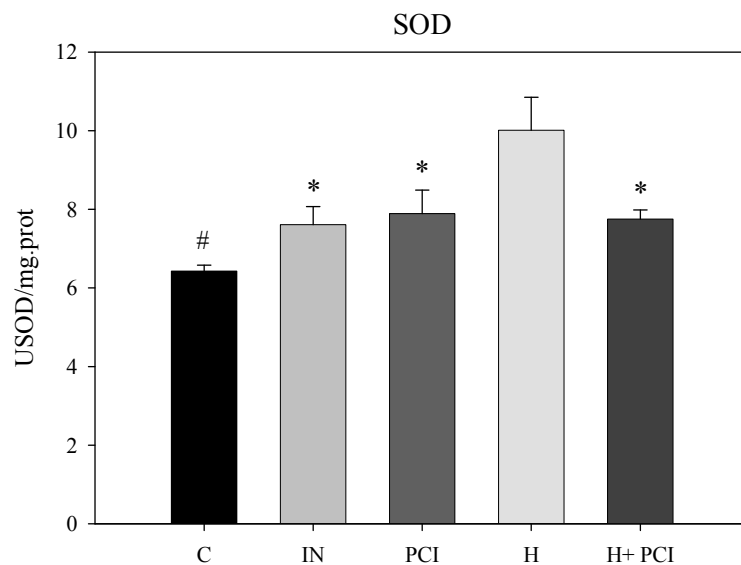


**Figura 7:** Níveis de TBARS ao término da reperfusão. \* $P < 0,05$  vs. H+PCI, # $P < 0,01$  vs. H+PCI e H. Dados expressos como Média  $\pm$  EP. Kruskal-Wallis, teste de Dunn para múltiplas comparações.

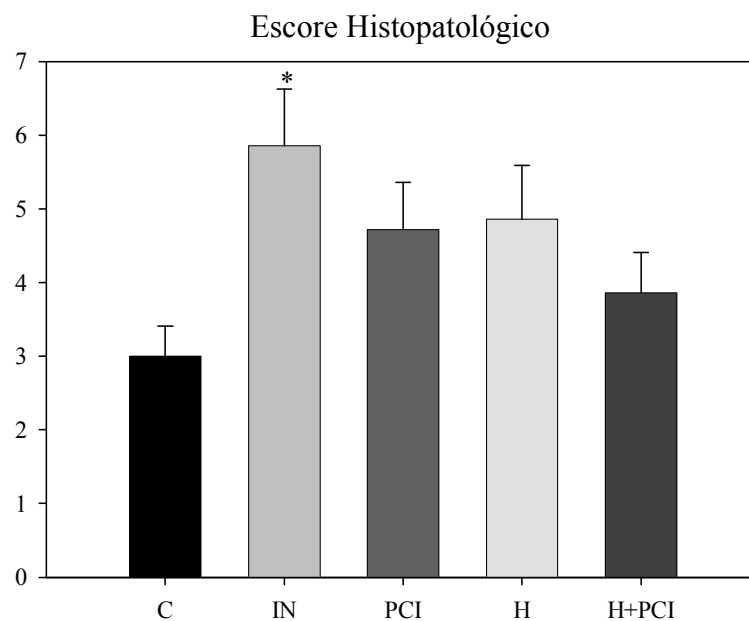


**Figura 8:** Níveis de Catalase ao término da reperfusão. \* $P < 0,05$  vs. PCI, # $P = 0,01$  vs. PCI. Dados expressos como Média  $\pm$  EP. One-way ANOVA, teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações.





**Figura 9:** Níveis de SOD ao término da reperfusão. # $P=0,01$  vs. H, \* $P<0,05$  vs. H. Dados expressos como Média  $\pm$  EP. One-way ANOVA, teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações.



**Figura 10:** Escore de danos histopatológicos. Cortes corados com HE foram avaliados para a presença de degeneração hidrópica (0-4), necrose hepatocelular (0-4) e infiltrados neutrofílicos (0-4). Dados expressos como Média  $\pm$  EP. Houve diferença significativa entre os grupos IN e C. \* $P<0,05$ . One-way ANOVA, teste de Tukey para múltiplas comparações.

## Referências bibliográficas:

1. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg*. 2003 Dec;238(6):843-50; discussion 51-2.
2. Yamanaka N, Yamanaka J, Tanaka T, Tanaka W, Yasui C, Ando T, et al. Topical cooling assisted hepatic resection of segment 7 and 8 oriented by en-bloc interruption of the targeted portal pedicles. *Hepatogastroenterology*. 1999 Jan-Feb;46(25):417-24.
3. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int*. 2006 Aug;26(6):734-41.
4. Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, et al. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2003 Oct 15;35(8):901-9.
5. Zar HA, Lancaster JR, Jr. Mild hypothermia protects against postischemic hepatic endothelial injury and decreases the formation of reactive oxygen species. *Redox Rep*. 2000;5(5):303-10.
6. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR, Jr. Mild therapeutic hypothermia for postischemic vasoconstriction in the perfused rat liver. *Anesthesiology*. 1999 Apr;90(4):1103-11.
7. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*. 1999 Jan;29(1):126-32.
8. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997 Apr;25(4):934-7.
9. Brooks G, Hearse DJ. Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: player or spectator? *Circ Res*. 1996 Sep;79(3):627-30.
10. Crenesse D, Laurens M, Gugenheim J, Heurteaux C, Cursio R, Rossi B, et al. Intermittent ischemia reduces warm hypoxia-reoxygenation-induced JNK(1)/SAPK(1) activation and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001 Nov;34(5):972-8.
11. Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA. Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol*. 2003 Dec;39(6):972-7.
12. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock*. 2005 Oct;24(4):370-5.

13. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)*. 2001 Jan;200(2):93-105.
14. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.
15. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1972 Jul;128(3):617-30.
16. Kirby TW, Fridovich I. A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem*. 1982 Dec;127(2):435-40.
17. An J, Camara AK, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jun;288(6):H2620-7.
18. Lee YJ, Miyake S, Wakita H, McMullen DC, Azuma Y, Auh S, et al. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 May;27(5):950-62.
19. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Apr;282(4):G608-16.
20. Imakita M, Yamanaka N, Kuroda N, Kitayama Y, Okamoto E. Does topical cooling alleviate ischemia/reperfusion injury during inflow occlusion in hepatectomy? Results of an experimental and clinical study. *Surg Today*. 2000;30(9):795-804.
21. Vejchapipat P, Poomsawat S, Poovorawan Y, Proctor E, Pierro A. The effects of moderate hypothermia on energy metabolism and serum inflammatory markers during laparotomy. *Pediatr Surg Int*. 2006 Jan;22(1):66-71.
22. Dinant S, van Veen SQ, Roseboom HJ, van Vliet AK, van Gulik TM. Liver protection by hypothermic perfusion at different temperatures during total vascular exclusion. *Liver Int*. 2006 May;26(4):486-93.
23. Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, van Gulik TM. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs. *Surgery*. 2003 Nov;134(5):806-17.
24. Shiratori Y, Kiriya H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci*. 1994 Jun;39(6):1265-72.
25. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol*. 2000 Mar;32(3):508-15.

26. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg*. 2000 Dec;191(6):650-6.
27. Niemann CU, Choi S, Behrends M, Hirose R, Noh J, Coatney JL, et al. Mild hypothermia protects obese rats from fulminant hepatic necrosis induced by ischemia-reperfusion. *Surgery*. 2006 Sep;140(3):404-12.
28. Vaquero J, Belanger M, James L, Herrero R, Desjardins P, Cote J, et al. Mild hypothermia attenuates liver injury and improves survival in mice with acetaminophen toxicity. *Gastroenterology*. 2007 Jan;132(1):372-83.
29. Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Dig Dis Sci*. 2007 May;52(5):1159-67.
30. Schiesser M, Wittert A, Nieuwenhuijs VB, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Intermittent Ischemia but Not Ischemic Preconditioning Is Effective in Restoring Bile Flow After Ischemia Reperfusion Injury in the Livers of Aged Rats. *J Surg Res*. 2008 Feb 1.
31. Takahashi K, Morikawa S, Inubushi T, Nosaka S. Protective effects of moderate hypothermia on phosphoenergetic metabolism in rat liver during gradual hypoxia studied by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Surg Res*. 2004 Apr;117(2):323-8.
32. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul;279(1):G163-71.
33. Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):1538-40.
34. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebah M, Ichai P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg*. 2006 Feb;202(2):203-11.
35. Pacheco EG, Gomes MC, Rodrigues GR, Campos W, Kemp R, Silva Ode C. Effect of liver ischemic preconditioning in cirrhotic rats submitted to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2006;21 Suppl 1:24-8.
36. Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl*. 2004 Apr;10(4):520-8.
37. Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 28;11(12):1825-8.

38. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):917-36.