

N-ACETILCISTEÍNA DIMINUI A CONGESTÃO HEPÁTICA NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO – ESTUDO EXPERIMENTAL

N-ACETYLCYSTEINE DECREASES HEPATIC CONGESTION IN THE ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY — EXPERIMENTAL STUDY

Eduardo Chaise Didon¹
Carlos Thadeu Cerski²
Antonio Nocchi Kalil, TCBC-RS³

RESUMO: Objetivos: A isquemia tem sido utilizada na cirurgia hepática desde o início do século. Embora possibilite a diminuição da perda sangüínea durante as ressecções e a manutenção do órgão à espera de um transplante, a ausência de perfusão traz como conseqüência um dano ao órgão, que se amplifica por ocasião da sua reoxigenação. A N-Acetilcisteína é uma droga capaz de repor os estoques celulares de glutatona, um antioxidante fundamental no controle das lesões resultantes do restabelecimento da perfusão sangüínea, esperando-se dessa forma que diminua a lesão acima descrita. Com o propósito de avaliar a capacidade da N-Acetilcisteína reduzir o dano hepático, utilizou-se um modelo murino de isquemia e reperfusão normotérmica. **Método:** Foram utilizados vinte ratos Wistar fêmeas, divididos em dois grupos. No grupo tratado, 400mg/kg de N-Acetilcisteína foram administrados pela via intravenosa, 15 minutos antes do clampeamento do pedículo do lobo esquerdo por 90 minutos. No grupo controle foi administrado o volume equivalente de solução fisiológica. Foi estabelecido um período de quatro horas de reperfusão, após o qual os animais foram sacrificados para a realização de análise histopatológica do lobo esquerdo com coloração de Hematoxilina-Eosina. A lesão tecidual foi quantificada quanto à presença de congestão, esteatose e necrose. **Resultados:** O estudo evidenciou a capacidade de a N-Acetilcisteína diminuir significativamente a congestão. Não houve diferenças quanto à presença de esteatose e necrose. **Conclusão:** Os resultados obtidos permitem-nos concluir que o uso prévio da N-Acetilcisteína nos processos de isquemia e reperfusão, em normotermia, é capaz de diminuir a congestão hepática. A N-Acetilcisteína não diminui a presença de esteatose e necrose.

Descritores: Isquemia e Reperfusão; Isquemia Hepática; N-Acetilcisteína

INTRODUÇÃO

A capacidade de agir de forma análoga à glutatona, reagindo com os radicais livres através dos grupos sulfidril (do elétron e transforma-se em cistina) ou como

substrato para a sua síntese (cedendo a cisteína), explica o mecanismo de ação da N-Acetilcisteína (NAC) como substância antioxidante¹. Essa propriedade tem originado diversos estudos que buscam elucidar a sua eficácia na prevenção e tratamento das lesões associadas à formação de

-
1. Mestre em Cirurgia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre/Santa Casa de Porto Alegre (FFFCMPA/ISCMPA).
 2. Professor de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
 3. Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Geral da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Chefe do Serviço de Cirurgia Oncológica do Hospital Santa Rita e do Serviço de Cirurgia Geral da Santa Casa de Porto Alegre.

Recebido em 20/03/2001

Aceito para publicação em 05/03/2002

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas/Santa Casa de Porto Alegre (FFFCMPA/ISCMPA).

radicais livres em vários órgãos, especialmente nos fenômenos envolvendo isquemia e reperusão¹⁻⁸. Esses fenômenos encontram-se presentes na maioria dos procedimentos cirúrgicos de grande porte atualmente realizados sobre o fígado, tais como manobra de Pringle para o controle de hemorragia no trauma hepático, oclusão vascular parcial ou total nas ressecções do parênquima e nos casos de substituição completa do órgão (transplante hepático ortotópico).

Em função das evidências de que a NAC pode exercer efeito protetor em órgãos submetidos a agressões (especialmente as de origem isquêmica), decidimos estudar os seus efeitos em um modelo experimental de isquemia e reperusão hepática sem hipotermia.

MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos fêmeas da linhagem Wistar com idade entre dez e 12 semanas. O peso dos animais variou de 235 a 325 gramas.

Os animais foram mantidos em grupos de até cinco a uma temperatura ambiente de 22 graus centígrados. Utilizou-se ração padronizada para roedores, a água foi fornecida *ad libitum* e os animais submetidos a ciclos de claro/escuro de 12 horas.

Os ratos foram divididos em dois subgrupos de dez (grupo tratamento e grupo controle), escolhidos por sorteio. Após o sorteio (uso ou não do fármaco), cada animal retirado aleatoriamente da gaiola foi colocado em recipiente transparente contendo éter sulfúrico. Depois de sedado, o animal foi pesado em balança com precisão de 1g e recebeu atropina na dose de 0,044mg/kg por administração subcutânea no dorso.

Decorridos dez minutos da administração da atropina foi realizada anestesia com injeção intraperitoneal de uma solução preparada com a mistura de cloridrato de quetamina na concentração de 50mg/ml e solução de xilazina na concentração de 20mg/ml. A aplicação inicial foi de 1ml do preparado por quilo de peso.

Após a obtenção de plano anestésico, o animal foi colocado em mesa cirúrgica própria para roedores e o procedimento teve início por uma laparotomia mediana com identificação da veia cava inferior infra-renal. A veia foi puncionada com agulha de insulina e, nos animais do grupo experimento, foi injetado NAC a 10% na dose de 400mg/kg lentamente. Nos animais do grupo controle, após o cálculo do volume necessário de solução de NAC a 10%, era administrado um volume equivalente de solução fisiológica a 0,9%.

Foi determinado um período de 15 minutos para ocorrer a distribuição do fármaco. Durante esse período foi realizada a exposição do fígado com secção dos ligamentos falciforme e coronário esquerdo. A manobra permitiu a tração do lobo hepático esquerdo até a superfície, identificando-se facilmente o seu pedículo. Ao ser completado o período predeterminado de 15 minutos, o pedículo do lobo esquerdo foi comprimido com clampe metálico atraumático tipo "Bulldog", sendo simultaneamente

administrada na cavidade peritoneal dose complementar de solução anestésica (metade da dose inicial). A instalação da isquemia foi comprovada poucos minutos após a colocação do clampe através de mudança de coloração do parênquima, que adquiriu aspecto escurecido. O abdome foi fechado provisoriamente com fio mononylon 5-0 para diminuir a perda de calor.

Ao ser atingido o período de 90 minutos de isquemia, o abdome foi novamente aberto, o clampe retirado e o lobo reperfundido, percebendo-se a retomada progressiva da coloração original. A parede abdominal foi novamente suturada e o animal retirado da mesa cirúrgica e recolocado em sua caixa para se recuperar do procedimento.

O tecido hepático submetido à isquemia foi reperfundido por quatro horas. Ao completar este prazo, os animais foram sacrificados através da separação da coluna cervical da base do crânio, realizado subitamente com um bastão. Nesse momento ainda havia algum grau de sedação devido à atividade dos anestésicos. O abdome foi rapidamente aberto e o lobo hepático esquerdo retirado e colocado em solução de formol a 10% com tampão fosfato.

As preparações histológicas foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (H-E). O material foi examinado por patologista de reconhecida experiência em patologia hepática e sem o conhecimento do grupo a que cada animal pertenceu. A avaliação de cada espécime foi feita com microscópio óptico, atribuindo-se um valor de 0 a 4 para as alterações morfológicas observadas em relação ao grau de congestão, necrose e vacuolização do citoplasma. Os critérios utilizados em cada alteração morfológica são apresentados na Tabela 1.

Para a comparação entre os grupos dos graus de congestão, necrose e esteatose, foi efetuada análise estatística com uso do teste t de Student, confirmado pelo teste U de Mann-Whitney.

A avaliação da diferença entre as médias de peso foi feita através do teste t de Student para amostras independentes.

Para todos os testes estatísticos foi determinado um nível de significância quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de pesos dos grupos (teste t para amostras independentes $P=0,597$).

Os resultados obtidos com a análise histopatológica estão representados na Figura 1. O uso da NAC diminuiu significativamente o grau de congestão hepática quando em comparação com o grupo controle. Sete dos dez animais que não receberam a droga apresentaram escores acima do valor um, enquanto, no grupo tratado, apenas três apresentaram escores acima do valor mínimo.

Não houve diferença entre os grupos em relação a esteatose e necrose. Em cada grupo, a esteatose não foi detectada em metade dos animais. Os outros 50% apresentaram distribuição dos dados idêntica (30% com este-

Tabela 1
Quantificação da lesão isquêmica

	<i>Congestão</i>	<i>Esteatose*</i>	<i>Necrose</i>
0	Ausente	Ausente	Ausente
1	Dilatação de veia centrolobular**	Menos de 10%	Hepatócitos isolados
2	Dilatação de veia centrolobular e dilatação de sinusóides em algumas zonas 3***	Entre 10 e 25%	Necrose confluyente limitada à zona 3
3	Dilatação de veia centrolobular e dilatação de sinusóides na maioria das zonas 3	Entre 25 e 50%	Necrose confluyente em zona 3 e 2
4	Dilatação de veia centrolobular e dilatação de sinusóides em zonas 2 e 3	Mais de 50%	Necrose generalizada

*Média de 10 ácidos examinados

**Em pelo menos 5 de 10 veias centrolobulares examinadas

***Dilatação presente em, no máximo, 4 de 10 ácidos examinados

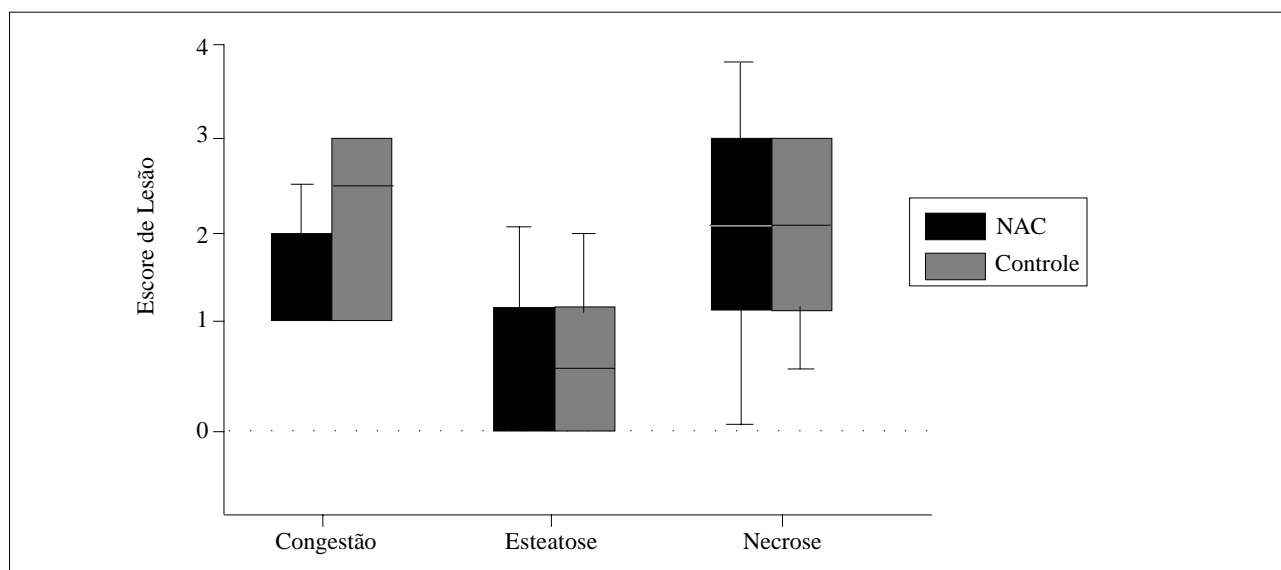


Figura 1. Representação gráfica dos resultados.

atose grau 1 e 20% com grau 2). A distribuição de valores em relação à necrose foi semelhante. O único animal com valor máximo (4) pertenceu ao grupo tratado (animal 25).

Os resultados da análise estatística estão representados na Tabela 2.

DISCUSSÃO

O emprego do clampeamento seletivo do lobo esquerdo nos modelos experimentais, embora não reproduza com total fidelidade a manobra de Pringle (oclusão total do pedículo), evita a congestão das demais vísceras intra-abdominais. A técnica utilizada permite estudar as alterações perfusionais hepáticas secundárias somente à isquemia e reperusão, uma vez que os parâmetros hemodinâmicos mantêm-se constantes (não ocorre altera-

ção em termos de frequência cardíaca, pressão arterial média e gases sanguíneos)⁹. Além disso, modelos experimentais com isquemia hepática total devem, preferencialmente, ser acompanhados de “bypass mesentérico-jugular” e heparinização sistêmica, o que aumenta o tempo cirúrgico, o risco de sangramento e a complexidade do procedimento¹⁰.

O tempo de isquemia normotérmica do lobo esquerdo foi fixado em 90 minutos, período julgado necessário para a instalação de lesão isquêmica significativa. A ausência de perfusão por até 30 minutos não afeta a viabilidade do tecido hepático normal (evidenciada pela recuperação da concentração celular de ATP logo após o restabelecimento do fluxo) e não causa lesão significativa à microscopia ótica^{11,12,13}. Da mesma forma, períodos de isquemia de até 45 minutos não causam a expressão das

Tabela 2
Resultado da análise estatística

Variável	Grupo controle	Grupo tratamento	P
Peso	239,5 ± 25,11*	245,5 ± 24,77*	0,597
Congestão	2,5 (1,0-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	0,048
Esteatose	0,5 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-1,0)	0,999
Necrose	2,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-3,0)	0,840

Todos os valores expressos em mediana e amplitude interquartil, exceto peso (*) expresso por média ± desvio-padrão.

moléculas de adesão ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) e LFA-1 (Lymphocyte-Function-Associate Antigen-1), não gerando lesão hepática significativa¹⁴.

Em relação à análise histopatológica, é provável que o grau de congestão seja mais importante do que o de necrose e esteatose para prever o funcionamento do órgão nas primeiras horas de reperfusão. O dano ao endotélio sinusoidal, após a reoxigenação, resulta em deficiência da microcirculação com conseqüente lesão hepatocelular¹⁵. A medida da microcirculação hepática feita por termodifusão, em um programa de transplante hepático clínico, permitiu correlacionar o *status* microcirculatório com o funcionamento pós-operatório. Foi demonstrado que baixos índices de perfusão tecidual (abaixo de 60ml de sangue por 100g de tecido por minuto) estão diretamente relacionados com lesões histológicas severas, menor atividade de síntese de fatores de coagulação e maiores taxas de transaminases séricas^{16,17}. É possível que a NAC, através da inativação dos radicais livres, possa também atuar como facilitadora da atuação tecidual do óxido nítrico, melhorando a perfusão^{18,19}.

É difícil definir a partir de que momento a presença de necrose deve ser valorizada na avaliação das lesões. O presente estudo demonstrou não haver diferença significativa com o uso da NAC em relação à necrose. Estudo experimental semelhante (90 minutos de isquemia e quatro horas de reperfusão)²⁰ avaliou o efeito de um inibidor da P-Selectina. Foram encontrados menores índices de transaminases séricas e mieloperoxidase tecidual com o uso da droga. Ao analisar os dados com a escala proposta por Suzuki e colaboradores²¹, obtiveram-se diferenças significativas quanto à congestão e vacuolização, sem obter diferença quanto à necrose.

Em estudo avaliando biopsias de 280 fígados antes de sua retirada para transplante, foi observada necrose leve

em 6% dos casos²². Apesar disso, o mau funcionamento do enxerto só pode ser associado com esteatose e baixa concentração de glicogênio pré-retirada, não sendo significativa a presença da necrose. Em outro estudo não foram encontrados achados em biopsia pré-transplante capazes de prever com segurança a evolução pós-operatória. Doze, dentre 27 pacientes com necrose moderada ou severa pré-reperfusão (44%), apresentaram uma evolução clínica favorável²³.

Em nosso trabalho, o uso da NAC não modificou o padrão histológico em relação à esteatose quando comparada com o grupo controle. A análise deste parâmetro torna-se difícil, uma vez que o significado da presença da esteatose não está totalmente esclarecido. Parece haver maiores índices de disfunção do enxerto quando fígados com esteatose prévia moderada ou severa são submetidos à isquemia fria e reperfusão²⁴, provavelmente devido a alterações na composição da membrana plasmática^{25,26}. Além disso, foi demonstrada uma correlação direta entre o grau de infiltração gordurosa e a má perfusão da microcirculação hepática²⁷.

Por sua vez, Burt e colaboradores referem que mesmo pacientes com esteatose microvesicular, geralmente associada a quadros agudos com risco de vida, podem ter recuperação sem alterações hepáticas residuais²⁸. Além disso, vários trabalhos recentes com modelos de I/R normotérmica não levam em conta o grau de esteatose por ocasião da análise histopatológica dos espécimes, valorizando a presença de congestão e de necrose^{14,29-31}.

Nós concluímos que a utilização prévia da NAC diminui o grau de congestão hepática nas lesões por isquemia e reperfusão quando comparada ao grupo controle de maneira significativa e que seu uso não determinou diferença entre os grupos quanto à presença de esteatose e necrose.

ABSTRACT

Background: Ischemia has been used in hepatic surgery since the beginning of the century. Its use results in less blood loss during hepatic resections and allow organ preservation while waiting for a transplant. Nevertheless, the lack of perfusion causes liver injury, worsen by the reoxygenation of the organ. N-Acetylcysteine is a drug capable of restoring cellular glutathione levels, essential to control reperfusion injury. Therefore, N-Acetylcysteine could be useful to lessen liver damage. To evaluate N-Acetylcysteine ability to reduce hepatic damage, a murine model of normothermic ischemia and reperfusion was used. **Methods:** Twenty female Wistar rats were divided

in two groups. In the first group, N-Acetylcysteine 400mg/kg was given intravenously fifteen minutes before the left hepatic lobe clamping. The clamp was kept in place for ninety minutes. In the control group, normal saline was given in an equivalent volume. After four hours of reperfusion, animals were killed and left lobes were submitted to histopathological analysis stained with Hematoxylin-Eosin. Specimens were evaluated for congestion, steatosis and necrosis. **Results:** Analysis showed N-Acetylcysteine capability of significantly decrease hepatic congestion. There was no difference in regard of steatosis and necrosis. **Conclusion:** We concluded that previous N-Acetylcysteine administration reduces congestion in normothermic ischemia-reperfusion of the liver lobe. The drug does not reduce steatosis or necrosis.

Key Words: Ischemia-Reperfusion; Hepatic Ischemia; N-Acetylcysteine.

REFERÊNCIAS

1. Fukuzawa K, Emre S, Senyuz O et al. N-Acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation* 1995; 59: 6-9.
2. Koepfel TA, Lehmann TG, Thies JC et al. Impact of N-Acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1397-402.
3. Thies JC, Koepfel TA, Lehmann T et al. Efficacy of N-Acetylcysteine as a hepatoprotective agent in liver transplantation: an experimental study. *Transplant Proc* 1997; 29: 1326-7.
4. Nakano H, Nagasaki H, Barama A et al. The effects of N-Acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine diet. *Hepatology* 1997; 26: 670-8.
5. Nakano H, Nagasaki H, Yoshida K et al. N-Acetylcysteine and anti-ICAM-1 monoclonal antibody reduce ischemia-reperfusion injury of the steatotic rat liver. *Transplant Proc* 1998; 30: 3763.
6. Ferrer JV, Ariceta J, Guerrero D et al. Allopurinol and N-Acetylcysteine avoid 60% of intestinal necrosis in an ischemia-reperfusion experimental model. *Transplant Proc* 1998; 30: 2672.
7. Schmidt W, Walther A, Gebhard MM et al. Influence of N-Acetylcysteine treatment on endotoxin-induced microcirculatory disturbances. *Intensive Care Med* 1998; 24: 967-72.
8. Tariq M, Morais C, Sobki S et al. N-Acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 923-9.
9. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R et al. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145: 1421-31.
10. Lloris-Carsi JM, Calvo MA, Suzuki S et al. Comparison of liver ischemia-reperfusion models in the rat with and without jugular-mesenteric bypass. *Transplant Proc* 1993; 25: 3301-2.
11. Nishimura T, Nakahara M, Kobayashi S et al. Ischemic injury in cirrhotic livers: an experimental study of the temporary arrest of hepatic circulation. *J Surg Res* 1992; 53: 227-33.
12. Rodriguez AA, LaMorte WW, Hanrahan LM et al. Liver viability after ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 1991; 126: 767-72.
13. Shiratori Y, Kiriya H, Fukushi Y et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Digest Dis Sci* 1994; 39: 1265-72.
14. Nakano H, Kuzume M, Namatame K et al. Efficacy of intraportal injection of anti-ICAM-1 monoclonal antibody against liver cell injury following warm ischemia in the rat. *Am J Surg* 1995; 170: 64-6.
15. Clemens MG, Chun K, Miescher E. Leukocyte-dependent and-independent hepatic microvascular injury during reperfusion after warm ischemia. In Messmer K, Menger MD (eds) : *Liver Microcirculation and Hepatobiliary Function*. Basel, S Karger, 1993, pp. 139-51.
16. Klar E, Brecht M, Kraus T et al. Early assessment of reperfusion injury by intraoperative quantification of hepatic microcirculation in patients. *Transplant Proc* 1997; 29: 362-3.
17. Angelescu M, Hofmann W, Zapletal C et al. Histomorphological analysis of preservation injury as determinant of graft quality in clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 1074-6.
18. Walsh TS, Lee A. N-Acetylcysteine administration in the critically ill. *Intensive Care Med* 1999; 25: 432-4.
19. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82: 1598-610.
20. Garcia-Criado FJ, Toledo-Pereyra LH, Lopez-Nebolina F et al. Role of P-selectin in total hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 327-34.
21. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55: 1265-72.
22. Bao YM, Adam R, Sebah M et al. Risk factors of preservation injury and prognostic value of reperfusion biopsy in outcome of liver transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28: 123-5.
23. Kakizoe S, Yanaga K, Starzl TE et al. Evaluation of protocol before transplantation and after reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: considerations of preservation and early immunological injury. *Hepatology* 1990; 11: 932-41.
24. Yoong KF, Gunson BK, Neil DAH et al. Impact of donor liver microvesicular steatosis on the outcome of liver retransplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 550-1.
25. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S et al. Why is a liver with steatosis susceptible to cold ischemic injury? *Transplant Proc* 1999; 31: 548-9.

26. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S et al. The mechanism of injury in a steatotic liver graft during cold preservation. *Transplantation* 1999; 67: 195-200.
27. Seifalian A, Piasecki C, Agarwal A et al. The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. *Transplantation* 1999; 68: 780-4.
28. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diag Pathol* 1998; 15: 246-58.
29. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S et al. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 43-52.
30. Urakami A, Todo S, Zhu Y et al. Attenuation of ischemic liver injury by monoclonal anti-endothelin antibody, AwETN40. *J Am Coll Surg* 1997; 185: 358-64.
31. Shito M, Wakabayashi G, Ueda 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; 63: 143-8.

Endereço para correspondência:
Dr. Antonio Nocchi Kalil
Rua Marcelo Gama, 924/2º andar
90540-041 — Porto Alegre-RS
E-mail: ankalil.voy@terra.com.br