

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITOS DO PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO E DO
PRECONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO COM A INFUSÃO
DE L-ARGININA INTRAPORTAL SOBRE AS LESÕES DE
ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICA NORMOTÉRMICA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS**

RAFAEL OMAR GIOVANARDI

Orientador: Prof. Dr. ERNANI LUIS RHODEN

TESE DE DOUTORADO

2006

G512e Giovanardi, Rafael Omar

Efeitos do condicionamento isquêmico e do condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal sobre as lesões de isquemia e reperfusão hepática normotérmica : estudo experimental em suínos/ Rafael Omar Giovanardi; orient. Ernani Luis Rhoden. – 2006.
285 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Isquemia 2. Reperfusão 3. Fígado 4. L-Arginina I.
Rhoden, Ernani Luis II. Título.

NLM: WI 140

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITOS DO PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO E DO
PRECONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO COM A INFUSÃO DE L-
ARGININA INTRAPORTAL SOBRE AS LESÕES DE ISQUEMIA E
REPERFUSÃO HEPÁTICA NORMOTÉRMICA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
SUÍNOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, para obtenção
do Título de Doutor.

Aluno: Rafael Omar Giovanardi

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Porto Alegre

Dezembro/2006

ALUNO

RAFAEL OMAR GIOVANARDI

Professor adjunto das Unidades: do Aparelho Digestivo e Propedêutica Cirúrgica e Anestésica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

Especialista em Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Diploma de Cirurgia Hepatobiliar pela Universidade de Paris SUD XI.

ORIENTADOR**ERNANI LUIS RHODEN**

Professor adjunto de Urologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

Livre Docente em Urologia pela FFFCMPA.

Professor do Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pós-doutorado em Urologia pela Harvard University, Boston, USA.

A grandeza não consiste em receber honras, mas merecê-las.

(Aristóteles 384 - 322 a.C.)

O significado das coisas não está nas coisas em si, mas sim em nossa atitude
em relação a elas.

(Antoine de Saint-Exupéry 1900 – 1944)

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Alessandra, que acompanhou todo este percurso.
Pelo amor e dedicação inquestionáveis, pelo estímulo e conselhos,
sempre serenos; mas, sobretudo, pela paciência despendida
durante todos os momentos que deixei de estar ao seu lado.

Aos meus pais, Omar e Noemy, pelo amor incondicional e constante estímulo,
desde meus primeiros anos, pela busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Ernani Luis Rhoden, orientador deste trabalho, manifesto minha sincera gratidão pelo apoio, orientação e ensinamento despendido nestes últimos anos. Em uma breve história, tenho o prazer de lembrar, que esta orientação, e o estímulo ao pensamento científico, sempre constante, iniciaram juntamente com os meus primeiros passos na residência em cirurgia da Santa Casa de Porto Alegre. Naquela ocasião, o então residente de cirurgia, Ernani Luis Rhoden, acendeu-me o espírito científico e orientou-me na confecção dos meus primeiros artigos. Sem dúvida, o professor Doutor Ernani Luis Rhoden, é para mim, um exemplo profissional e um cientista, que tenho grande admiração. Muito obrigado.

A professora Doutora Sandra Costa Fuchs, coordenadora do curso de pós-graduação em Ciências Médicas da UFRGS, meus sinceros agradecimentos pelo apoio oferecido em toda a realização do curso.

Ao professor Doutor Carlos Thadeu Cerski, do serviço de patologia do HCPA, pela dedicação no auxílio para as análises histológicas deste trabalho.

A professora Doutora Miriam Salvador, do Instituto de Biotecnologia da UCS, pela orientação, e colaboração nas determinações bioquímicas deste trabalho.

As biólogas Maína Bonetti e Ana Brittes, do laboratório de microscopia eletrônica da ULBRA, pelo apoio e orientação na análise das lâminas de microscopia eletrônica.

Ao grupo de anesthesiologistas reunidos, sem os quais, seria impossível a realização deste experimento.

A minha família, sou grato pelo apoio em todas as etapas da minha carreira.

Ao meu irmão, Henrique, pelo apoio e companheirismo durante a realização, e para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Zé, e a Marga, meus sogro e sogra, que me acolheram como filho. Pelos conselhos valiosos, estímulo e vibração com todas as minhas conquistas.

Aos acadêmicos: Diana Bordin, do curso de bioquímica da UCS; Alexandre Telli da Silva; Caetano Sehbe De Carli; Cláudia Moraes; Diogo Balbinot; Gustavo Fiedler; Rodrigo Zampieri; do curso de medicina da UCS, pela dedicação e auxílio em todas as etapas que se fizeram necessárias para que este trabalho pudesse ser realizado.

A funcionária do biotério, *Dona Neli*, pela sempre pronta disponibilidade no atendimento todas às solicitações e cuidados com os animais para realização deste experimento.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos professores Doutores Antônio Nocchi Kalil e Luiz Pereira-Lima, meus dois mestres e incentivadores da cirurgia hepatobiliopancreática. Tenho muita satisfação em tê-los como examinadores e avaliadores deste trabalho, que é fruto da minha dedicação ao estudo do fígado, e que foi semeado, com certeza, pelos vossos ensinamentos, recebido durante a minha formação acadêmica. Aos professores, meu agradecimento sincero.

SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Efeitos celulares da isquemia e reperfusão tecidual.....	8
3.1.1 Isquemia tecidual.....	9
3.1.2 Reperfusão tecidual.....	10
3.2 Espécies ativas do oxigênio envolvidos na isquemia e reperfusão.....	13
3.3 Fontes e geração das espécies ativas do oxigênio.....	16
3.4 Óxido nítrico e isquemia e reperfusão tecidual.....	20
3.5 Estresse oxidativo e isquemia e reperfusão tecidual.....	24
3.6 Principais antioxidantes enzimáticos envolvidos nas lesões de isquemia e reperfusão tecidual.....	28
3.6.1 Superóxido dismutase.....	29
3.6.2 Catalase.....	30
3.6.3 Glutathiona-peroxidase.....	31
3.7 Apoptose/Necrose e isquemia-reperfusão hepática.....	32
3.8 Caspase e isquemia-reperfusão hepática.....	35
3.9 Mitocôndrias e isquemia-reperfusão hepática.....	39

3.10	Precondicionamento isquêmico e isquemia-reperfusão hepática....	43
3.11	L-arginina e isquemia-reperfusão hepática.....	47
3.12	Modelos experimentais e isquemia-reperfusão hepática.....	50
4.	JUSTIFICATIVA.....	52
5.	OBJETIVOS.....	55
5.1.	Objetivo geral.....	55
5.2.	Objetivos específicos.....	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7.	ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	88
7.1	Versão em português.....	89
7.2.	Versão em inglês.....	130
8.	ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	169
8.1	Versão em português.....	170
8.2	Versão em inglês.....	212
9.	CONCLUSÕES.....	253
10.	ANEXOS.....	256
10.1	Tabelas.....	256
10.1.1	Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis Peso, AST, ALT e Produção de bile.....	257
10.1.2	Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).....	258
10.1.3	Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis Congestão sinusoidal, Degeneração balonizante, Necrose, Infiltração de Polimorfonucleares e Esteatose.....	259

10.1.4 Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis Apoptose e Área das Mitocôndrias pela Microscopia Eletrônica.....	260
10.1.5. Comparação da Atividade da Caspase-3 entre Zonas Centrolobular / Zona Portal e Células Hepáticas.....	261
10.2 GRÁFICOS.....	262
10.2.1 Níveis séricos da AST 180 minutos de reperfusão.....	263
10.2.2 Níveis séricos da ALT 180 minutos de reperfusão.....	264
10.2.3 Produção de blie durante os 180 minutos de reperfusão	265
10.2.4 Níveis séricos do substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	266
10.2.5 Níveis séricos da superóxido dismutase (SOD).....	267
10.2.6 Níveis séricos da catalase (CAT).....	268
10.2.7 Congestão sinusoidal.....	269
10.2.8 Infiltação de Polimorfonucleares.....	270
10.2.9 Contagem Total de células apoptóticas pela atividade da Caspase-3.....	271
10.2.10 Contagem de Células Apoptóticas na Zona Centrolobular pela atividade da Caspase-3.....	272
10.2.11 Contagem de Células Apoptóticas na Zona Portal pela atividade da Caspase-3.....	273
10.2.12 Área das Mitocôndrias.....	274
10.3. FOTOS REPRESENTATIVAS.....	275

10.3.1 Foto da congestão sinusoidal no grupo controle.....	276
10.3.2 Foto da congestão sinusoidal no grupo não precondicionado.....	276
10.3.3 Foto da congestão sinusoidal no grupo condicionamento isquêmico.....	277
10.3.4 Foto da congestão sinusoidal no grupo condicionamento farmacológico com L-arginina.....	277
10.3.5 Foto representativa da infiltração de polimorfonucleares no grupo controle.....	278
10.3.6 Foto representativa da infiltração de polimorfonucleares no grupo não condicionado.....	278
10.3.7 Fotos da Atividade da Caspase 3 no grupo Controle.....	279
10.3.8 Fotos da Atividade da Caspase 3 no grupo não precondicionado.....	280
10.3.9 Fotos da Atividade da Caspase 3 no grupo condicionamento isquêmico.....	281
10.3.10 Fotos da Atividade da Caspase 3 no grupo condicionamento farmacológico com L-arginina.....	281
10.3.11 Foto das Mitocôndrias no grupo controle.....	282
10.3.12 Foto das Mitocôndrias no grupo não condicionado...	283
10.3.13 Foto das Mitocôndrias no grupo condicionamento isquêmico.....	284
10.3.14 Foto das Mitocôndrias no grupo condicionamento farmacológico com L-arginina.....	285

1. ABREVIATURAS

Alguns termos empregados no texto são melhor reconhecidos por suas abreviaturas em língua inglesa, desta forma, decidiu-se manter este padrão. Nesses casos, além da descrição da abreviatura em inglês, uma versão em português é apresentada. Os termos aqui empregados estão de acordo com a indexação do vocabulário médico (*Medical Subjects Headings, MeSH*) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos.

A2 - receptores da adenosina A2

ADP - adenosina difosfatada

AMP - adenosina monofosfatada

APAF-1 – apoptotic protease activating factor 1, fator apoptótico ativador de proteases

AST – aspartato aminotransferase

ALT – alanino aminotransferase

ATP - adenosina trifosfatada

blebs superficiais- pequenas protruções da membrana

Ca⁺² - cálcio

Cu⁺² - Cobre

CAT - catalase

DP – desvio padrão

EAO - espécies ativas de oxigênio

ET - endotelina

EAN - espécies ativas do nitrogênio

Fé⁺² - Ferro

GPx - glutathiona-peroxidase

GR - glutathiona-redutase

G₆PD - glicose-6-fosfato desidrogenase
GMPc - guanosina monofosfatada cíclica
HOCL - ácido hipocloroso
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HSPs – hot shock protein, proteínas do choque quente
IL - interleucina
IL-6 - interleucina-6
IM - espaço intermembrana
IPC – *ischemic preconditioning*, condicionamento isquêmico
IPC+IR – grupo submetido ao condicionamento isquêmico antes da isquemia e reperfusão
IR- grupo isquemia e reperfusão
K_m – constante de Michaelis-Menten
L-a+IR – grupo submetido ao condicionamento farmacológico com L-arginin 10 minutos antes da isquemia
MDA - malondialdeído
MPO - mieloperoxidase
MPT – *mitochondrial permeability transition*, transição da permeabilidade mitocondrial
MME - membrana mitocondrial externa
NO – nitric oxide, óxido nítrico
NOS – *nitric oxide sintase*, óxido nítrico sintase
cNOS - óxido nítrico sintase constitutiva
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
iNOS - óxido nítrico sintase induzível
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal
NO⁺ - cátion nitrosônio
N₂O - óxido nitroso
NOx - nitrite and nitrate, nitrito e nitrato
NO₃⁻ - Nitrate, nitrato
NO₂⁻ - nitrite, nitrito
N₂O₃ – *dinitrogen trioxide*, dinitrogênio trióxido
NADPH oxidase - nicotinamida adenina dinucleotide fosfato oxidase

$O_2^{\bullet-}$ - Superóxido

$ONOO^-$ - peroxinitrito

OH^{\bullet} - radical hidroxila

PAF - fator ativador das plaquetas

PMNs – *polymorphonuclear leukocytes*, leucócitos polimorfonucleares

PAF - fator ativador das plaquetas

PTP - *permeability transition pore*, poros da transição da permeabilidade

PGI₂ – prostaglandina

QL - quimiluminescência

RL - radicais livres

REG - retículo endoplasmático granular

REL - retículo endoplasmático liso

SIRS - síndrome da resposta inflamatória sistêmica

-SH - grupos tiol

SOD - superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF – *tumor necrosis factor*, fator de necrose tumoral

XOR - xantina/xantina oxidoreductase

$\bar{X} \pm DP$ – média \pm desvio padrão

ZCL – zona centrolobular

ZP – zona portal

2. INTRODUÇÃO

A isquemia e reperfusão hepática é um fenômeno complexo que envolve inúmeros mecanismos fisiopatológicos, bem como um grande número de fatores e mediadores. As relações entre os envolvidos são altamente complexas, e ainda não é possível descrever com absoluta certeza os eventos que ocorrem desde o início até o fim do processo.¹ A lesão de isquemia e reperfusão hepática é reconhecida como uma importante causa de morbidade e mortalidade após ressecções hepáticas maiores^{2, 3} e no transplante de fígado.^{4, 5} Ocorre também após hipóxia sistêmica ou em condições de baixo fluxo, o que resulta em perfusão hepática insuficiente. Esta última pode ocorrer após choque hemorrágico, choque cardiogênico ou mesmo choque séptico.⁶ Outras situações em que também se pode observar baixa perfusão do órgão é na cirurgia cardiovascular com circulação extracorpórea,⁷ na cirurgia laparoscópica⁸⁻¹⁰ e em síndromes compartimentais abdominais.¹¹

Nesse contexto, a lesão hepática de isquemia e reperfusão pode ser decorrente de uma das três formas de isquemia. A isquemia fria (ou hipotérmica), a isquemia quente (ou normotérmica) e a isquemia de reaquecimento (*rewarming*).¹² A isquemia fria ocorre quase exclusivamente no transplante hepático, quando é aplicada intencionalmente para reduzir a atividade metabólica do enxerto, enquanto o órgão espera para ser reimplantado. A isquemia normotérmica ocorre em uma série de outras situações, incluindo também transplante, trauma, choque (nos seus diversos tipos) e a cirurgia hepática, quando se realiza a oclusão do fluxo sangüíneo aferente ao fígado (manobra de *Pringle*), ou quando se realiza a oclusão vascular total, ambas com a finalidade de diminuir as perdas sangüíneas durante a secção do parênquima hepático. A isquemia de reaquecimento (*rewarming ischemia*) tipicamente ocorre

durante a manipulação do enxerto (ou seja, preparando o fígado no *ex situ*), ou durante o período de reconstrução vascular do enxerto, quando o fígado é submetido à temperatura ambiente e à temperatura corporal até que se reestabeleça o fluxo sanguíneo portal.¹³

A isquemia prolongada resulta em uma variedade de mudanças no metabolismo e na ultra-estrutura celular. O insuficiente suprimento sanguíneo ao órgão e, por conseguinte, às células deste reduz rapidamente o nível de energia nas mesmas, levando, conseqüentemente, a falhas em determinadas etapas do metabolismo, com acúmulo de metabólitos nocivos às células.¹⁴⁻¹⁷ A célula, privada de seu combustível básico, passa a obter energia por meio do metabolismo anaeróbico, o que resulta em acidose láctica.

O meio ácido é inadequado para a cinética normal das enzimas, privando a célula dos seus mecanismos para manutenção da homeostase.¹⁸ O sofrimento da membrana plasmática provoca alterações eletrolíticas, que, acompanhadas da perda dos mecanismos de produção de adenosina trifosfatada (ATP) levam à perda da capacidade de síntese celular. O cálcio provoca disfunção da membrana mitocondrial e lesão irreversível. Segue-se autólise secundária à isquemia, com edema e extravazamento do conteúdo dos lisossomos, vazamento de enzimas e proteínas, vacuolização do retículo endoplasmático e descaracterização da compartimentalização celular. A integridade das membranas não pode ser mantida, e a célula morre.¹⁸⁻²⁰ Uma vez que a isquemia não resulte em lesão irreversível, induz a um estado pró-inflamatório, que aumenta a vulnerabilidade tecidual e favorece lesão adicional durante a reperfusão.²¹

Ao restaurar o fluxo sanguíneo, impõe-se nova agressão ao fígado, aumentando-se a lesão causada pelo período de isquemia, que, segundo alguns autores, é, na realidade, tão ou mais deletério que o período isquêmico propriamente dito.⁹ Esse fenômeno é conhecido como lesão de isquemia e reperfusão, que é, na verdade, um fenômeno de acentuação da lesão celular de um órgão isquêmico, após o restabelecimento do fluxo sanguíneo e de oxigênio.²²⁻²⁴ A lesão hepática,

após o início da reperfusão, é resultado da inter-relação de diferentes mecanismos. Nos estágios iniciais da reperfusão, o edema das células endoteliais,²⁵ vasoconstrição,²⁶ adesão leucocitária,^{27, 28} e agregação plaquetária no interior dos sinusóides²⁹ resulta em falência da microcirculação.

O edema das células endoteliais e das células de Kupffer é resultado do edema intracelular devido à falência do transporte ativo transmembrana secundário à deficiência de energia (ATP) induzida pela isquemia.²⁵ A vasoconstrição é resultado da deterioração no frágil balanço entre o óxido nítrico (NO) e a endotelina [ET], o que resulta em estreitamento do lúmen sinusoidal, com conseqüente decréscimo da velocidade dos sinusóides. A freqüência do contato dos leucócitos com as células endoteliais é, dessa forma, aumentada, o que resulta em leucoestase.

A estase dos leucócitos, embora incapaz de ocluir completamente o lúmen dos sinusóides, resulta em fator adicional para diminuir o fluxo na microcirculação hepática.³⁰ Esse fenômeno leva a um prolongamento do período de hipóxia, deixando áreas do fígado ainda isquêmicas, mesmo após o início da reperfusão (fenômeno do não-refluxo). Associa-se a esse mecanismo a ativação das células de Kupffer e neutrófilos, as quais produzem citocinas inflamatórias³¹ e espécies ativas de oxigênio (EAO),³² o que resulta em maior agravamento da lesão hepática.

Portanto, a isquemia e reperfusão hepática está associada a vários eventos que envolvem inúmeros componentes celulares, sem uma evidência clara de quais mecanismos levam de fato à morte celular. Além disso, ocorre em diversas situações clínicas, tem um importante impacto no resultado clínico dos pacientes, permanece como uma área de constantes descobertas e é fonte inesgotável de pesquisas, tendo em vista a importância que esses processos representam para a biologia orgânica e, conseqüentemente, para a aplicação clínica.³³ O conhecimento dos mecanismos que envolvem a isquemia e reperfusão é de grande interesse, uma vez que podem auxiliar na redução da lesão dos tecidos e órgãos submetidos a esse complexo fenômeno.

Dessa forma, as estratégias terapêuticas visam a interromper os fenômenos patogênicos em algum ponto desse evento isquêmico-reperfusional. Nesse contexto, várias tentativas, tanto farmacológicas quanto cirúrgicas, têm sido motivo de muitas publicações.¹³ As estratégias mais promissoras envolvem a oclusão pedicular total intermitente e o pré-condicionamento isquêmico do fígado, os quais são usados durante a cirurgia hepática.¹³ Em teoria, o condicionamento isquêmico evita a necessidade de liberação intermitente do pedículo hepático, ou seja, do fluxo sanguíneo aferente ao fígado, o que diminui o sangramento durante a secção do parênquima e estende o período de isquemia segura pelo aumento da tolerância do fígado à isquemia.³⁴

O condicionamento isquêmico também está associado à melhor tolerância do enxerto hepático às lesões de isquemia e reperfusão.^{35, 36} Entretanto, a validade clínica desse método ainda necessita ser determinada em outros estudos.³⁶ Um grande número de agentes farmacológicos também têm sido utilizados com o objetivo de atenuar as lesões de isquemia e reperfusão no fígado. Esses agentes podem tanto bloquear as vias de lesão diretamente quanto eles submetem o fígado a um condicionamento farmacológico, ou seja, induzem um baixo nível de estresse nas células hepáticas; e estas, por sua vez, iniciam um mecanismo de defesa celular contra um posterior insulto mais agressivo.¹³

Entre essas substâncias, pode-se relacionar antioxidantes, inibidores das proteases e moléculas anti-apoptóticas, agonistas da adenosina, doadores do NO ou precursores do NO (L-arginina), entre outros.^{1, 13} A maioria desses agentes, entretanto, não tem aplicabilidade clínica comprovada.¹³

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Efeitos celulares da isquemia e reperfusão tecidual

A célula é envolta por delgadas membranas lipoprotéicas (membrana celular), o citoplasma (membrana citoplasmática), o núcleo (membrana nuclear) e as diferentes organelas intracitoplasmáticas, com o objetivo de manter a arquitetura celular e os processos metabólitos que dependem da integridade das mesmas.³⁷⁻
³⁹ Elas são denominadas membranas lipoprotéicas porque apresentam, na sua constituição, uma dupla camada formada por lipídios e porque, mergulhadas no seu interior, encontram-se moléculas proteicas.^{38, 40} Essa conformação é responsável pela manutenção do funcionamento celular, ou seja, os lipídios constituem uma barreira que impede o livre movimento da água de um compartimento celular para outro, enquanto as moléculas proteicas interrompem essa barreira, proporcionando assim vias de passagem para várias substâncias, além de exercer funções enzimáticas essenciais à vida celular.^{38, 40} Portanto, além da estrutura individualizada e bem definida de cada unidade celular, vários processos metabólicos ocorrem, tanto para manter a arquitetura celular quanto para manter a atividade funcional específica de cada célula em determinado órgão.^{38, 40}

A célula, para executar suas funções específicas, depende de energia, fundamentalmente sob a forma de adenosina trifosfatada (ATP), e diversos mecanismos metabólicos são envolvidos no processo de geração da mesma.^{38,}
⁴⁰ O ATP é uma combinação de adenina, ribose e três radicais de fosfato, unindo-se os dois últimos radicais restantes da molécula, através de ligações de energia. Após a perda de um radical de fosfato do ATP, o composto torna-se adenosina difosfatada (ADP) e, após a perda do segundo radical de fosfato, o

mesmo passa a ser a adenosina monofosfatada (AMP). Tais situações ocorrem continuamente durante o metabolismo da célula envolvido na execução de suas funções específicas.^{38, 40, 41} Além disso, diferentes processos metabólicos, como o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), ciclo das pentoses, a fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte de elétrons, entre outros, são importantes fontes geradoras de energia celular.^{38, 40}

3.1.1 Isquemia tecidual

Na lesão celular reversível, o primeiro ponto afetado pela isquemia é a respiração aeróbica das células, ou seja, a função respiratória mitocondrial. Esse fenômeno resulta na diminuição da fosforilação oxidativa, diminuição da geração de ATP e conseqüente aumento de AMP. Altas taxas de AMP estimulam as atividades da fosfofrutoquinase e do glicogênio fosforilase, resultando em maior glicólise anaeróbica. Ocorre acúmulo de ácido láctico, que faz reduzir o pH celular, conduzindo inicialmente a um agrupamento da cromatina nuclear. A queda nos níveis de ATP leva a um distúrbio na bomba de sódio e potássio, que causa acúmulo de Na^+ intracelular, difusão de K^+ para fora da célula e aumento do influxo de Ca^{+2} . O ganho de soluto é acompanhado de um ganho isosmótico de água e de conseqüente edema celular.⁴²

Além disso, o catabolismo dos nucleotídeos, durante a isquemia, resulta em acúmulo intracelular de hipoxantina, que é subseqüentemente convertida em radicais tóxicos de oxigênio (espécies ativas de oxigênio), com a reintrodução da nova molécula de oxigênio (durante a reperfusão). No endotélio, a isquemia promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios (moléculas de adesão dos leucócitos, citoquinas), agentes bioativos (endotelina, tromboxano A2) em nível endotelial, enquanto suprime outros fatores de proteção (óxido nítrico sintase constitutiva, trombomodulina) e agentes bioativos (prostaciclina, óxido nítrico).²¹ Associam-se a esses processos a disfunção mitocondrial, que é ativada por várias vias não relacionadas e utiliza diferentes tipos de proteínas para ativar vias de morte celular. Dessa maneira, a isquemia induz a um estado pró-

inflamatório que aumenta a vulnerabilidade tecidual, favorecendo lesão adicional durante a reperfusão.⁴³

O acúmulo intracelular de cálcio é também fortemente implicado no desenvolvimento da lesão isquêmica e parece ser um evento crucial para o dano irreversível.⁴⁴ O aumento dos níveis de cálcio no citosol causa ativação das fosfolipases das membranas celulares, resultando em degradação dos fosfolipídeos e o rompimento da membrana celular.⁴⁵ Anteriormente à morte celular, os hepatócitos e outras células desenvolvem um estado caracterizado pela transição da permeabilidade mitocondrial^{46,47}, rompimento dos lisossomos, formação de *bleb* na membrana, edema celular e extravazamento de solutos de pequena massa molecular.^{48,49} O cálcio também ativa a xantina oxidoreductase, que tem papel na produção de radicais livres de oxigênio, logo após a reperfusão.⁵⁰

Embora os mecanismos básicos da lesão isquêmica após a isquemia quente e fria, sejam similares, existem algumas diferenças. No transplante hepático, o fígado é submetido a uma isquemia fria seguido por uma isquemia com reaquecimento (*rewarming ischemia*) e, posteriormente, a reperfusão.¹³ A isquemia fria está associada principalmente à queda da fosforilação oxidativa, a baixos níveis de ATP e a um aumento da glicólise,⁵¹ enquanto a isquemia normotérmica resulta em aumento do estresse oxidativo e alteração na função mitocondrial.^{52,53}

3.1.2 Reperfusão tecidual

O grau de lesão provocado pela isquemia depende do tipo de tecido, da espécie envolvida e do tempo que o órgão permanece em hipóxia e/ou isquemia. A supressão de oxigênio, durante períodos curtos, leva a danos geralmente reversíveis; caso contrário, as alterações progridem e podem chegar a comprometer estruturas vitais da célula, levando a morte celular.¹⁶ Uma vez que o período de isquemia a que o tecido foi submetido não tenha sido

suficientemente longo, para provocar dano celular irreversível, a reperfusão com sangue oxigenado e nutrientes pode recuperar lesões das estruturas celulares. Portanto, a reperfusão tem duas conseqüências benéficas: a oferta de energia é restaurada, e os metabólitos tóxicos são removidos. Por outro lado, a reperfusão causa também graves conseqüências metabólicas e maior lesão tecidual que a causada pela isquemia (configurando a síndrome de isquemia e reperfusão).^{18, 19,}

54

A lesão hepática, após o início da reperfusão, é resultado de inter-relação entre diferentes mecanismos. Nos estágios precoces da reperfusão ocorre edema das células endoteliais,²⁵ vasoconstrição,²⁶ aderência leucocitária,^{27, 28} e agregação das plaquetas nos sinusóides²⁹ o que resulta em distúrbios na microcirculação. O “inchaço” das células endoteliais e células de Kupffer é resultado do edema intracelular subsequente à falência da atividade do transporte transmembrana secundário à deficiência de energia induzida pela isquemia, como referido anteriormente.²⁵

A vasoconstrição é resultante da deterioração do delicado balanço entre a concentração de óxido nítrico e da endotelina, o que resulta em contração da luz sinusoidal, com conseqüente decréscimo da velocidade dos leucócitos, e em estase leucocitária, servindo como um obstáculo ao fluxo na microcirculação hepática.³⁰ Isto prolonga o período de hipóxia (termo designado como *no reflow*), mantendo áreas hepáticas isquêmicas, mesmo após o início da reperfusão.

Esses insultos são acompanhados pela ativação das células de Kupffer e por neutrófilos, os quais são responsáveis pela produção das citocinas inflamatórias³¹ e espécies reativas de oxigênio³², favorecendo o agravamento da lesão hepática.

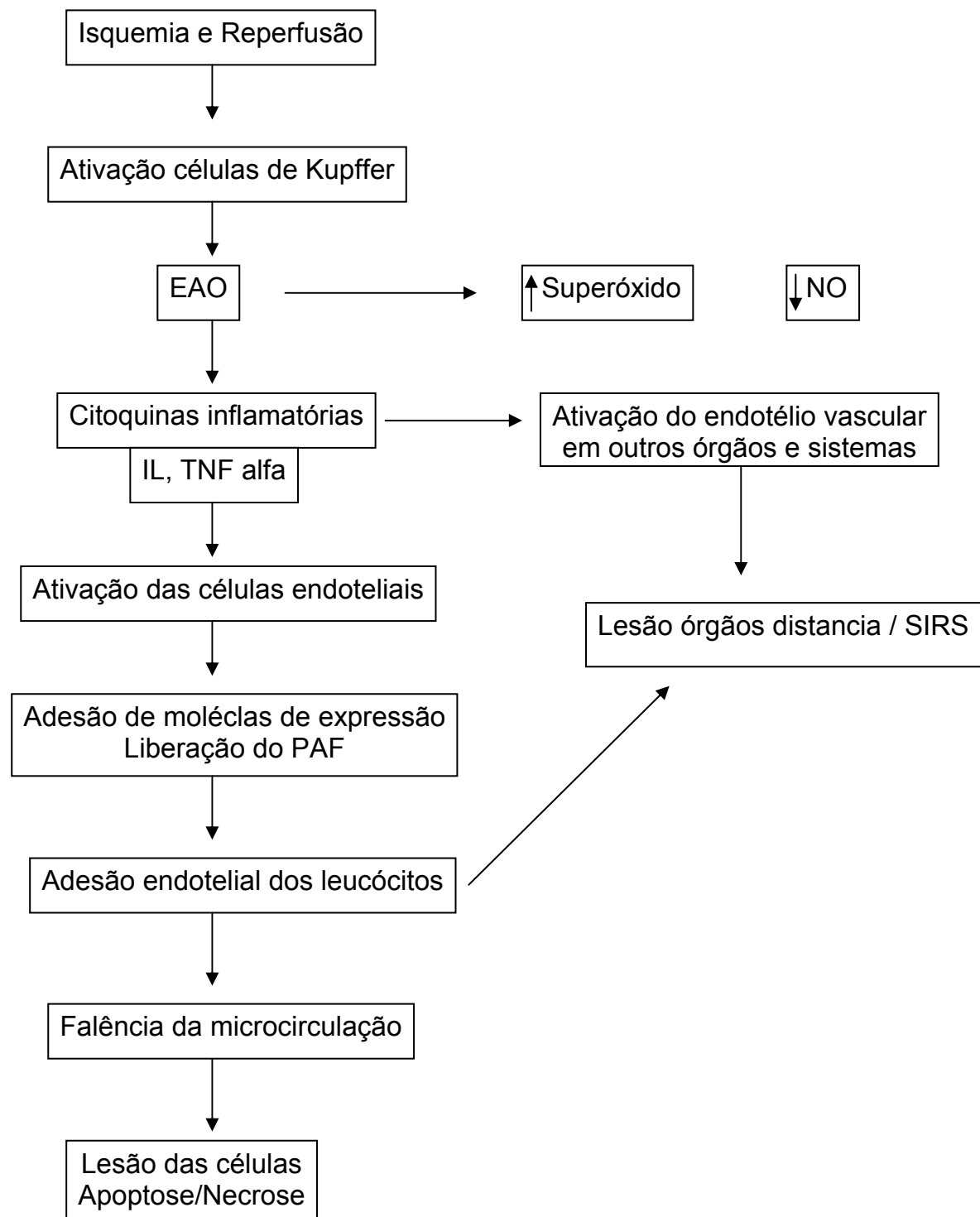


Figura 1: Esquema ilustrando os eventos patofisiológicos após a reperfusão hepática. EAO = Espécies ativas do oxigênio; IL = interleucina; TNF = fator de necrose tumoral; PAF = fator ativador das plaquetas; SIRS = síndrome da resposta inflamatória sistêmica (figura adaptada de Koti, 2003).³⁵

3.2 Espécies ativas do oxigênio envolvidos na isquemia e reperfusão tecidual

A complexidade dos eventos em nível celular é extrema, envolvendo uma série bastante ampla de rotas metabólicas, apenas à geração de energia para que a célula execute suas funções em determinado órgão. Há participação do oxigênio em todos os eventos funcionais que se processam em nível celular, basicamente em seres aeróbicos, e ele permeia praticamente todos os eventos funcionais que se processam nesse plano, como fonte energética para diferentes processos metabólicos e, por conseguinte, para a funcionalidade dos órgãos.^{39, 40}

Entretanto, o metabolismo do oxigênio leva também à formação de substâncias deletérias. Atualmente, está claro que processos enzimáticos e não-enzimáticos, que ocorrem em nível celular, permeados pelo oxigênio, levam a uma contínua produção de espécies ativas de oxigênio, que necessitam ser detoxicados pelo organismo, em função do seu potencial efeito lesivo.^{16, 55-57}

Portanto, embora o oxigênio seja a molécula biológica mais importante para sustentar a vida, ele é também a principal fonte de formação de radicais livres. Um radical livre (RL) é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso o torna muito instável, extraordinariamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas. A grande maioria dos radicais livres possui meia-vida muito curta, indo de segundos a nanosegundos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos, como as membranas celulares.^{18, 19, 58}

O oxigênio molecular (O_2) é fundamentalmente um birradical, ou seja, é uma molécula com dois elétrons desemparelhados, o que o torna pouco reativo.¹⁹ Assim, o oxigênio só pode reagir com moléculas com configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das moléculas não são birradicais, o oxigênio fica impedido (por restrição *de spin*) de reagir com as mesmas, evitando assim que

alvos celulares importantes sejam lesados. No entanto, o processo de transferência de elétrons ou a absorção de energia, pode levar o oxigênio a gerar as espécies ativas do oxigênio. Espécies ativas de oxigênio é uma expressão coletiva freqüentemente usado, para incluir não apenas radicais livres de oxigênio, como alguns não-radicais derivados do O_2 , capazes de gerar radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCL), entre outros.

O mecanismo de controle sobre esses elementos, desenvolvido pelos seres aeróbicos, para sobreviver em meios ricos em oxigênio ocorre através da completa redução do oxigênio à água. Dessa maneira, a compreensão das etapas pelas quais esse fenômeno se processa é de fundamental importância no que se refere à formação de EAO.^{14, 59} De forma sumarizada, essa redução envolve a adição de quatro elétrons a cada molécula de oxigênio, podendo esse ocorrer de forma tetra ou monovalente.^{14, 40}

Na primeira situação, responsável pelo metabolismo (redução) de 95% do oxigênio, o mesmo recebe quatro elétrons de uma só vez, formando água, sendo esta mediada pela via do citocromo oxidase e utilizada para gerar ATP (processo conhecido também por glicólise aeróbica).^{14, 40, 59} Nos 5% restantes, o processo ocorre de forma monovalente, isto é, o oxigênio recebe um elétron de cada vez (mono, di e trirredução), formando uma série de elementos intermediários tóxicos e reativos denominados EAO, cujos principais representantes são o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, respectivamente.^{15, 59}

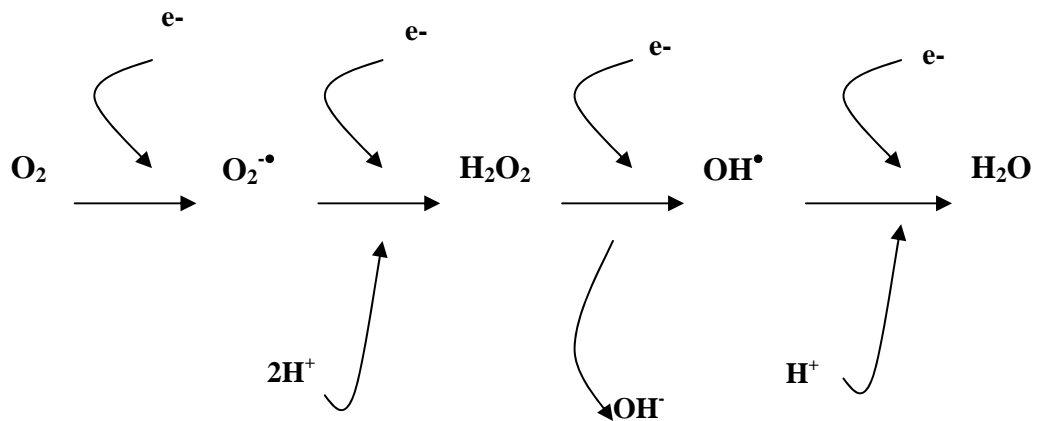


Figura 2: Geração de espécies ativas de oxigênio a partir da redução do oxigênio.¹⁴

A toxicidade tecidual decorrente da geração do superóxido é baseada na sua direta reatividade com vários tipos de moléculas biológicas (tipicamente lipídios, DNA, RNA, catecolaminas e esteróides) e da sua dismutação para formar peróxido de hidrogênio.⁶⁰ Apesar de o nome sugerir que o radical superóxido tem alto poder oxidante, ele atua na maioria das reações como um agente redutor.⁶¹ Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não seja estritamente um radical livre por definição, ele é uma EAO importante por sua capacidade de gerar o radical hidroxila (OH^{\bullet}) em presença de metais como ferro e cobre. O H_2O_2 é formado, principalmente, na matriz mitocondrial, durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD).⁶² Apesar de ser um agente oxidante fraco, pode inativar enzimas por oxidação de grupos tiol ($-\text{SH}$) essenciais, como por exemplo os da enzima glicolítica gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase.⁶¹

Além disso, o H_2O_2 pode atravessar membranas biológicas, ou seja, tem a capacidade de difundir-se rapidamente. O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é o mais reativo dos radicais livres do sistema biológico e é provavelmente o responsável pela

maioria das lesões celulares observadas. Uma vez formado, reage rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. A capacidade desse radical em lesar as células é superior às demais EAO, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxila.^{18, 19, 54, 63} Cabe ressaltar que a toxicidade do oxigênio não se deve apenas aos radicais livres dele derivados, mas também a outros estados do oxigênio, como o oxigênio *singlet* (estado excitado do oxigênio molecular).^{14, 40, 59}

Portanto, o equilíbrio entre a formação contínua de EAO e os mecanismos de destoxicação desses elementos ocorre em paralelo, em nível celular, com o intuito de promover a manutenção de sua integridade e, conseqüentemente, a do órgão.^{15, 64, 65} Essa relação e a sucessão de eventos metabólicos somente são mantidas quando as condições fundamentais são preservadas, ou seja, a arquitetura celular e das membranas, que envolve as células e suas estruturas intracelulares e o contínuo suprimento de sangue e, por conseguinte, de nutrientes para o metabolismo celular.^{15, 64, 65}

3.3 Fontes e geração das espécies ativas do oxigênio

As principais fontes das EAO, nos seres vivos aeróbicos, podem ser divididas em exógenas e endógenas.^{16, 40, 59} Entre as primeiras, destacam-se as substâncias com potencial redox (paraquat, doxorubicina, entre outras), drogas oxidantes (paracetamol, tetracloreto de carbono), fumo, radiação ionizante, luz solar e substâncias oxidantes do glutathione.^{16, 40} Dentre as fontes endógenas, há a atividade mitocondrial (cadeia de transporte de elétrons), microsomal (cadeia de transporte de elétrons), dos cloroplastos (cadeia de transporte de elétrons), das enzimas oxidantes (xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, monoaminoxidase, galactose oxidase), das células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos) e das reações auto-oxidantes (Fe^{2+} , adrenalina), entre outras.^{40, 66}

O mecanismo da xantina oxidase é um dos mais amplamente estudados no que tange a formação de EAO, no chamado fenômeno de isquemia e reperfusão.^{57, 66-72} A diminuição ou supressão de oxigênio no tecido diminui os níveis de ATP e, conseqüentemente, causa o acúmulo de hipoxantina e xantina (derivada de 5'-monofosfato de adenosina) (AMP) e subseqüente geração de EAO, com a re-oxigenação tecidual.⁴²

Normalmente, a hipoxantina é oxidada pela xantina desidrogenase em xantina. Entretanto, durante a isquemia, a xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase. A xantina desidrogenase usa nicotinamida adenina dinucleotídeo como substrato; por outro lado, a xantina oxidase usa o oxigênio e, portanto, durante a isquemia, fica incapaz de catalizar a conversão de hipoxantina em xantina, resultando em um acúmulo de hipoxantina.

Para que ocorra a destoxicação decorrente do acúmulo de hipoxantina e xantina, a enzima xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase através da oxidação dos grupos tióis e/ou proteólise estimulada pelo influxo de Ca^{+2} . Quando o oxigênio é reintroduzido durante a reperfusão, ocorre a conversão do excesso de hipoxantina pela xantina oxidase, resultando na formação de EAO, ou seja, a xantina oxidase em presença de oxigênio (reperfusão), converte a hipoxantina em xantina e leva à formação de ácido úrico, $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Na reperfusão, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é produzido. A reação do radical superóxido, com o peróxido de hidrogênio, forma o radical hidroxila (OH^{\cdot}), através da reação de Haber-Weiss; além disso, a formação do radical hidroxila, a partir do peróxido de hidrogênio, pode ser catalisada pela presença de íons de metais de transição (Fe^{+2} , Cu^{+2}) pela reação de Fenton.^{19, 54, 65, 73}

A geração de radicais livres, durante a reperfusão, também pode ser explicada pela hipótese mitocondrial. O metabolismo oxidativo em mamíferos envolve a redução de oxigênio molecular na mitocôndria por quatro elétrons. Esse processo ocorre com 95-98% do oxigênio consumido pelos tecidos. Porém, o

restante do oxigênio (2-5%) pode não receber todos os elétrons, produzindo, conseqüentemente, as EAO.¹⁴

Durante a isquemia, há grave diminuição dos componentes da cadeia respiratória localizada na mitocôndria. Durante a reperfusão, ocorre produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).⁷⁴ Sob condições normais, aproximadamente 1% a 3% do oxigênio, que é metabolizado nas mitocôndrias, é convertido em radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).⁷⁵ O ânion superóxido intramitocondrial, incapaz de se difundir para fora da mitocôndria, gera peróxido de hidrogênio por meio da ação da enzima Mn-superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio difunde-se para o citosol. O resultado da geração de superóxido intramitocondrial será o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio em toda a célula. Este irá reagir com grupos hemes de citocromos citosólicos e intra-mitocondriais, gerando espécies oxidativas extremamente reativas e capazes de iniciar as lesões observadas.¹⁸

A mitocôndria é capaz de produzir também óxido nítrico (NO^{\bullet}) através de uma óxido nítrico sintase (NOS) cálcio dependente, localizada na membrana interna mitocondrial.⁷⁶ A aptidão da matriz mitocondrial em produzir NO^{\bullet} tem várias implicações. Por um lado, o NO^{\bullet} poderia atuar como um mensageiro fisiológico que modula a velocidade do fluxo de elétrons em certas condições fisiológicas (por exemplo a hipóxia). Do mesmo modo, é possível imaginar uma variedade de cenários, em que a combinação de NO^{\bullet} e $O_2^{\bullet-}$ leve à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$).

É dessa forma que o NO^{\bullet} pode reagir diretamente com as hemoproteínas (por exemplo, o complexo III da cadeia respiratória), para inibir a capacidade de transportar elétrons.⁷⁷ Como resultado dessa inibição, acumulam-se elétrons na cadeia respiratória, o que leva a que alguns dos componentes mitocondriais – não todos – aumentem a geração de $O_2^{\bullet-}$ e, com isso, de $ONOO^-$ e de H_2O_2 . A geração desses oxidantes levaria à oxidação de proteínas e à liberação do citocromo c para o citoplasma, dando início à apoptose celular.⁷⁸

Os leucócitos polimorfonucleares constituem uma fonte importante de EAO, quando ativados por proteínas específicas. Estes possuem em suas membranas a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, geradora de radical $O_2^{\bullet-}$ que, em presença de íons ferro, transforma-se no radical OH^{\bullet} . Outro destino para o radical $O_2^{\bullet-}$ é ser dismutado pela SOD, gerando H_2O_2 que, por sua vez, pode reagir com íons Cl^- , numa reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO), gerando ácido hipocloroso (HClO). O HClO é altamente reativo e, juntamente com as outras EAO formadas, atua como defesa bactericida nas células.^{54, 64}

Outra fonte de radicais livres são os peroxissomos e o retículo endoplasmático. Os peroxissomos contêm altas concentrações de catalase, que converte o H_2O_2 (produzido pela β -oxidação de ác. graxos) em H_2O e O_2 .⁵⁴ Caso o H_2O_2 gerado não seja dismutado pelo sistema peroxissomal, haverá dano celular. O retículo endoplasmático, em que o citocromo P-450 está localizado, catalisa reações que geram $O_2^{\bullet-}$, mediante mecanismos dependentes de NADPH. Esse sistema de citocromos apresenta condições apropriadas para a formação de radicais livres: íons de metais de transição, oxigênio e reações de transferência de elétrons. O citocromo P-450 é responsável pela destoxicação de drogas, tais como: benzeno, álcool, inseticidas clorados, paraquat, antimaláricos, antitumorais e antifúngicos.⁷⁹ Alguns compostos que sofrem destoxicação por reações catalisadas pelo citocromo P-450, convertem-se em intermediários reativos que iniciam a peroxidação lipídica, provocando dano à membrana microssomal que causa, por sua vez, dano hepatocelular.⁸⁰

Portanto, a lesão celular induzida pela isquemia e reperfusão hepática é causada, pelo menos parcialmente, pelas EAO, bem como pelas espécies ativas do nitrogênio (EAN). Existem evidências de que durante a isquemia e reperfusão hepática ocorre a geração e a liberação de EAO e EAN com consumo de antioxidantes endógenos e morte celular por apoptose ou necrose.⁸¹⁻⁸⁵

Embora a exata fonte da geração de EAO está ainda sob investigação, a nicotinamida adenino dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), o sistema xantina/xantina oxidase (XO) e as mitocôndrias têm sido implicados como tendo papéis chave.⁸⁶ Embora a XOR foi tida como principal fonte de estresse oxidativo pós-isquemia no fígado, recentes evidências sugerem que a XO teria um papel secundário, se comparado com o papel da mitocôndria.⁸⁷

3.4 Óxido nítrico e isquemia e reperfusão tecidual

As células endoteliais possuem a capacidade de sintetizar diversas substâncias envolvidas na modulação do tônus vascular e que causam relaxamento muscular e vasodilatação, entre as quais podem ser destacados: prostaglandina (PGI₂), adenosina e óxido nítrico.^{40, 88-90} Após a isquemia e reperfusão, a influência do endotélio pode ser perdida através da *down-regulation*, ou inativação das prostaglandinas, adenosinas, e a liberação do NO pode ser comprometida, aspectos que permitem uma vasoconstrição sem oposição, o que exacerba o insulto isquêmico.^{40, 91-93}

Esses fenômenos podem ocorrer em parte pela ação das EAO, liberadas pelas células endoteliais hipóxicas e pelos neutrófilos aderentes, que são potentes inibidores do NO. Além disso, a hipóxia que se segue a re-oxigenação resulta em uma liberação excessiva de endotelina-1, o vasoconstritor mais potente já identificado.^{2, 40, 91, 94-97}

O NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominado óxido nítrico sintases (NOS), que converte o aminoácido L-arginina em radical NO e em L-citrulina.⁹⁸ As enzimas NOS podem ser classificadas em duas categorias: a) constitutivas (cNOS), que se caracterizam por ser cálcio e calmodulina-dependentes e conterem flavina, fosfatos dinucleotídeos de adenina e tetrahydrobiopterina e produzem pequenas quantidades de NO.^{40, 99} Essa enzima apresenta expressão nas células endoteliais (eNOS) e neuronais (nNOS); b) induzível (iNOS), que requer co-fatores similares aos descritos acima e são cálcio e calmodulina-independentes.^{40, 99} Essa tem sido identificada em um grande

número de células, como: macrófagos, células de Kupffer, hepatócitos, entre outras, e apresentam a característica de produzir grandes quantidades de NO.^{88, 99, 100}

Portanto, existem duas principais NOS no fígado: a NOS endotelial constitutiva (eNOS) e a NOS induzida (iNOS).¹⁰¹ Sob condições fisiológicas somente a eNOS está presente no fígado, e o baixo nível de NO produzido regula a perfusão hepática, previne agregação plaquetária, trombose, acúmulo de polimorfonucleares e secreção de mediadores inflamatórios.^{102, 103} O NO também induz vasodilatação em nível dos sinusóides e dos sítios pré-sinusoidais,^{104, 105} para manter um balanço com substâncias vasoconstritoras como a endotelina.¹⁰⁶ Por outro lado, especificamente no que se refere ao estresse oxidativo, o NO, por apresentar um elétron desemparelhado na camada mais externa, possui a capacidade de interagir com outra molécula, podendo funcionar como *acceptor* de elétrons de espécies radicais e, portanto, exercer uma ação de *scavenger* do ânion superóxido.^{40, 107, 108} Embora exista uma produção endógena basal, conforme a demanda de NO, e que, portanto, pode agir como *scavenger* de EAO de forma contínua, essa produção não parece ser suficiente para essa finalidade, haja vista que a síntese endógena do mesmo não foi capaz de evitar a ocorrência de produtos de lipoperoxidação.^{40, 108, 109}

Assim, efeitos da iNOS na lesão de isquemia e reperfusão hepática na literatura são ambivalentes, podendo ser tóxicos ou protetores. Os efeitos estão na dependência do tipo de agressão, do nível e da duração da expressão da iNOS e da produção simultânea do ânion superóxido.⁶⁰ Na isquemia e reperfusão hepática, a expressão do mensageiro RNA para a iNOS começa uma hora após a reperfusão e aumenta a atividade da iNOS após 5 horas da reperfusão.¹¹⁰ Alguns estudos sugerem que a expressão da iNOS tem efeitos deletérios para a função hepática,¹¹¹⁻¹¹³ enquanto outros sugerem efeitos benéficos^{114, 115} e outros, ainda, que não há efeito algum.¹¹⁶

O potencial ambivalente do NO baseia-se também na sua conformação. O NO é instável eletricamente, pelo fato de apresentar um elétron desemparelhado na

sua camada orbital mais externa, o que o condiciona a uma possível ação citotóxica quando da sua interação com espécies radicais.^{40, 117} Na realidade, o NO, em função do exposto, é uma espécie radical, porém não é altamente reativo quando considerado isoladamente. Entretanto, pode reagir rapidamente com um seletivo grupo de outros radicais e com metais de transição, como ferro da hemoglobina.^{40, 117} Esses aspectos podem ser observados, por exemplo, quando da interação do NO com o radical superóxido, que pode levar à produção de peroxinitrito, um poderoso oxidante com uma reatividade similar ao radical hidroxil.^{40, 117, 118} O peroxinitrito pode causar lesão celular mediante vários mecanismos: peroxidação lipídica, inibição direta das enzimas da cadeia respiratória, inibição da atividade da membrana sódio/potássio ATPase ou codificação da oxidação de proteínas com a formação de nitrotirosina.¹¹⁹

A partir do exposto, observa-se que o NO pode apresentar efeitos citotóxicos e benéficos, fisiopatologicamente em diversas situações, entre as quais o fenômeno da isquemia e reperfusão, de forma que as suas ações não estão completamente definidas.¹

O óxido nítrico, também chamado de monóxido de nitrogênio, é uma molécula paramagnética e um radical livre, pois possui um elétron não pareado na sua camada de valência. Quando esse elétron é removido por oxidação, forma-se o cátion nitrosônio (NO^+), e quando há redução de um elétron, o ânion nitroxila¹¹³ é produzido.¹²⁰ O ânion NO^- é muito reativo, podendo gerar óxido nitroso (N_2O) e possivelmente o radical hidroxil. Quando reage com O_2 , resulta em peroxinitrito conforme reação abaixo (ONOO^-).⁵⁴

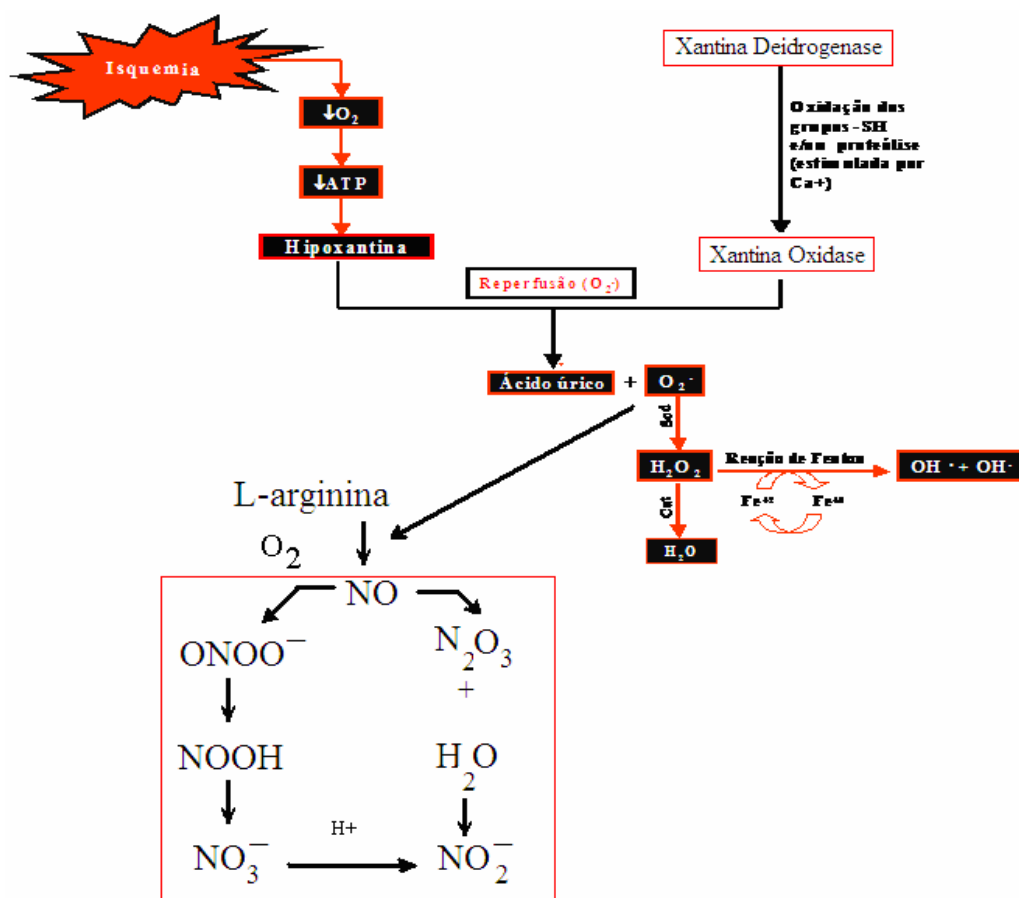


Figura 3: Mecanismo de geração de radicais livres na isquemia e reperfusão (Figura adaptada de Halliwell, 2000 e Rhoden, 2001).^{40, 54} Durante a isquemia, produtos de Adenosina Trifosfatada (ATP) são degradados até a hipoxantina, substrato para a ação da enzima xantina oxidase (formada a partir da deidroxantina oxidase por uma proteólise limitada em presença de cálcio) levando à formação de uratos e radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Reação de dismutação: radical superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Catalase converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Reação de Fenton: peróxido de hidrogênio em presença de metais de transição (ferro) origina o radical hidroxil (OH^{\bullet}) com atividade oxidativa e pode ativar a fosfolipase originando leucotrienos e fatores de ativação plaquetária, entre outros. O óxido nítrico pode agir como detoxificador do radical superóxido, formando nitrato, a partir da decomposição de peroxinitrito (produto de formação transitória), ou através da formação de óxido nitroso, em presença de oxigênio e água do meio.

3.5 Estresse oxidativo e isquemia e reperfusão tecidual

Os radicais livres, como referido anteriormente, formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. Entretanto, distúrbios do equilíbrio entre a formação e a remoção de EAO ou EAN são importantes na patogênese de muitas doenças e situações, aumentando o potencial de estresse oxidativo.^{121, 122} Grande quantidade de componentes celulares é capaz de reagir com os radicais livres, são eles: pequenas moléculas de aminoácidos insaturados, bases de ácidos nucleicos de carboidratos e lipídios insaturados das membranas, macromoléculas de proteínas DNA e ácido hialurônico. O principal efeito dos radicais livres é a peroxidação dos lipídios. As membranas celulares são compostas por fosfolípidos e ácidos graxos insaturados.

As EAO, em função de suas propriedades oxidativas, podem agir diretamente sobre os ácidos graxos presentes nos fosfolípidos constituintes das membranas celulares.^{40, 64} Esse fenômeno também pode se processar, indiretamente, por meio de radicais lipídicos peroxidados, além de outros produtos da fragmentação lipídica, que por si são agentes oxidantes.^{14, 40, 123} Além disso, uma das características mais importantes das EAO é a sua propriedade de gerar reações em cadeia para produzir espécies radicais, resultando em uma amplificação do processo em seqüência, que culmina com um efeito destrutivo sobre as células adjacentes.^{64, 124}

A peroxidação lipídica, portanto, resulta de uma série de reações em cadeia (um radical livre reage com um composto não radical, formando outro radical livre).¹²⁴ Essas reações apresentam basicamente três estágios: iniciação, propagação e terminação.¹²⁵

No primeiro, a EAO promove um ataque a uma molécula orgânica (ex.: ácidos graxos da cadeia lateral de lipídios), retirando um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Isso leva à formação de um radical centrado no carbono (-CH-), que tende a se estabilizar, por rearranjo molecular, formando um dieno

conjugado que, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz lipídios peróxidos (radical peroxil).

No estágio seguinte, a propagação e o radical peroxil pode retirar hidrogênio de outra molécula lipídica, originando novos radicais reativos, ou se combinar com átomos de hidrogênio, produzindo lipídios hidroperóxidos. Estes últimos sofrem a fase de terminação, na qual, pela presença de complexos como os metais (Ferro e Cobre), ocorre uma decomposição, originando aldeídos (malondialdeído), hidroperóxidos voláteis (pentano, etano) e outros produtos passíveis de ser identificados experimentalmente.^{69, 126-128} Nesta etapa de terminação, dois radicais peroxil podem reagir entre si formando um tetróxido instável, que se decompõe, originando oxigênio *singlet* e carbonilas excitadas. Essas espécies excitadas retornam ao estado fundamental, emitindo quantas de luz visível. Esse processo é conhecido como quimioluminescência e constitui num importante método de quantificação da peroxidação lipídica.^{33, 40, 129}

O método mais antigo e mais utilizado para medir a peroxidação de ácidos graxos, membranas e alimentos é o teste das substâncias ativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesse método, o MDA (malondialdeído), que é formado durante a peroxidação lipídica e pode ser usado como marcador de lipoperoxidação, reage com o TBARS para gerar um composto colorido que é detectado espectrofotometricamente em 530nm.¹³⁰ Dessa maneira, a peroxidação lipídica é um processo complexo e ocorre em múltiplos estágios. Por isso, muitas técnicas são utilizadas para medir a peroxidação de lipídios de membrana, lipoproteínas ou ácidos graxos. Cada técnica mede um produto resultante diferente, não sendo correto afirmar que uma só técnica mede a peroxidação lipídica total.¹²²

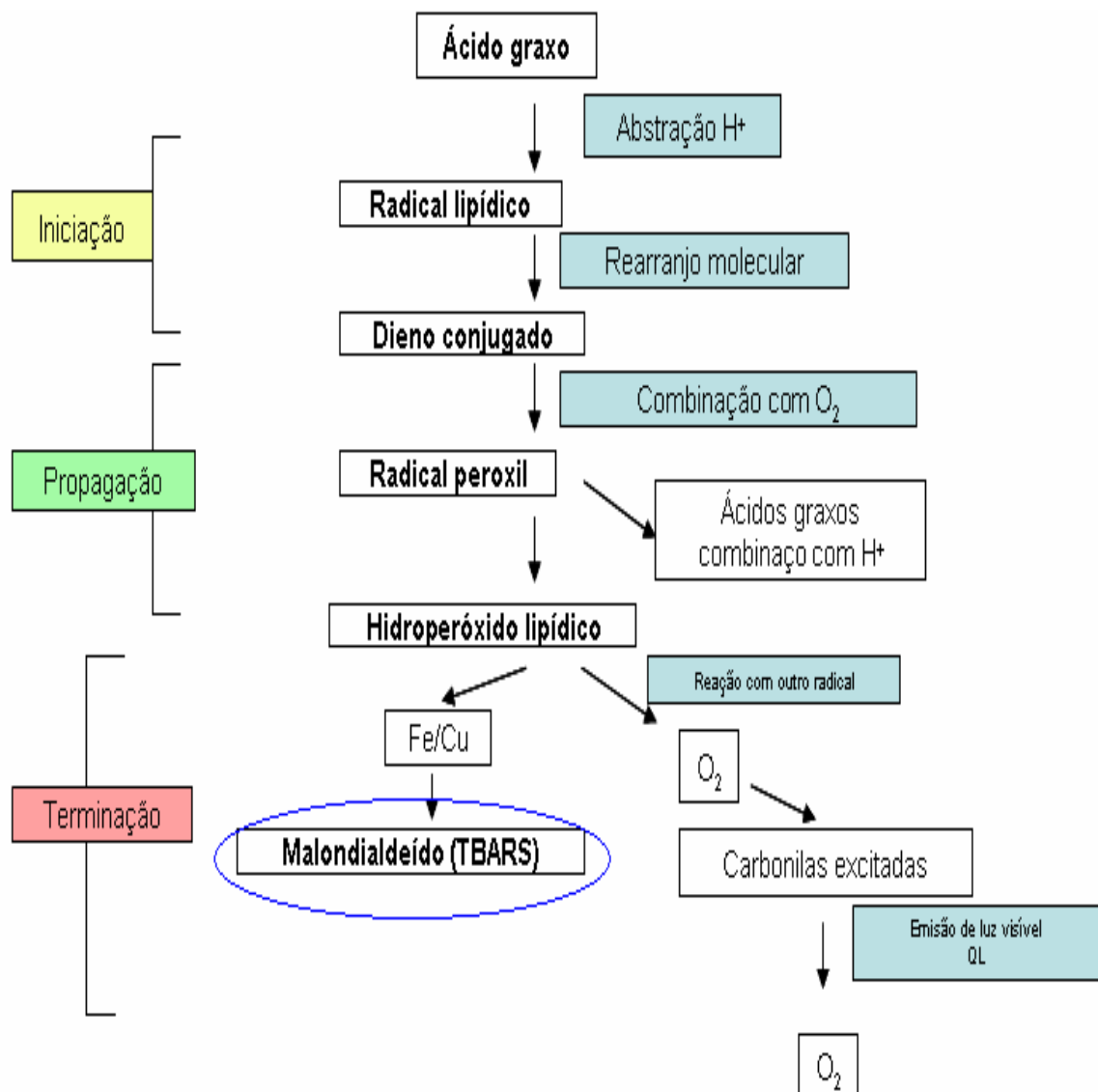


Figura 5: Representação esquemática das três etapas da lipoperoxidação de membranas celulares em cadeia: a) iniciação (ataque a uma molécula orgânica); b) propagação (reações químicas que culminam com a formação do hidroperóxido); c) terminação (reações catalisadas por metais, produzindo aldeídos como o malondialdeído e a emissão de quantas de luz visível). TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; QL: quimiluminescência. (Adaptado de: Del Maestro 1980)⁵⁹

As EAO podem afetar, além da membrana celular, os constituintes intracelulares, como as membranas das organelas citosólicas, entre as quais podem ser destacadas as mitocôndrias e os lisossomas.^{17, 40, 131} Esse processo pode levar à ruptura lisossômica, com conseqüente liberação de enzimas citotóxicas, que podem potencializar a lesão celular induzida pelo radical livre.^{14, 15, 69, 132} O dano celular que se segue à ruptura lisossomal é provavelmente devido à liberação de espécies reativas tóxicas e enzimas hidrolíticas.^{14, 40}

Por sua vez, as mitocôndrias, que normalmente são envoltas por membranas, além de serem vulneráveis a tal ação oxidativa, funcionam, também, como uma contínua fonte de geração de EAO através do mecanismo denominado cadeia de transporte de elétrons, e a ruptura da barreira imposta pela sua membrana permite o extravazamento de espécies radicais para o meio citosólico.^{14, 40, 133} Todos esses eventos processam-se de forma seqüencial e contínua em um meio já deficiente de mecanismos celulares de defesa, denominados *scavengers* (enzimáticos e não-enzimáticos), ou levando a um consumo excessivo dos mesmos, por uma sobrecarga de espécies oxidativas oriundas do fenômeno isquêmico-reperfusional, que tem como conseqüência lesão e morte da célula.

O grande problema relacionado às EAO e EAN é a dificuldade de suas medições *in vivo*. A única técnica que permite a detecção de radicais livres diretamente é a *electron spin resonance*, algumas vezes chamada *electron paramagnetic resonance*. O método *electron spin resonance* apresenta algumas desvantagens, pois, em materiais biológicos, é insensível a radicais muito reativos como o $O_2^{\bullet -}$ e o radical OH^{\bullet} , podendo identificar somente a presença de radicais pouco reativos, como o radical ascorbil.⁵⁴

Na técnica de *spin trapping*, o radical reage com uma molécula *trap* (armadilha) para resultar em um ou mais produtos estáveis, que então podem ser medidos.¹³⁴ O método *spin trapping* é muito utilizado em estudos *in vitro*, mas seu uso tem sido limitado em humanos. O ponto a ser considerado é que moléculas *trap* perturbam o sistema investigado. Por exemplo, quando o dano é causado pelo radical OH^{\bullet} e for adicionada uma molécula *trap*, o dano no

material biológico deverá decrescer, o que interferirá na detecção dos danos causados pelo radical OH^\bullet .

3.6 Principais antioxidantes enzimáticos envolvidos nas lesões de isquemia e reperfusão dos tecidos

Os seres vivos possuem mecanismos endógenos para reagir aos efeitos de radicais livres. Esses mecanismos são conhecidos como sistemas antioxidantes de defesa, na proteção ou reparação de moléculas agredidas pela oxidação. O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona-redutase (GR)¹³⁵

Há os antioxidantes não enzimáticos, tais como a ceruloplasmina, em razão da sua capacidade de metabolizar o íon superóxido; a transferrina e a lactoferrina que inibem a peroxidação lipídica ferro-dependente, além da albumina, mioglobina, ferritina, e pequenas moléculas não enzimáticas, tais como ácido ascórbico e o α -tocoferol, que age por inibir a propagação de radicais livres dentro da membrana celular, carotenóides, glutaciona, bilirrubina, ubiquinona e ácido úrico.^{54, 136}

A destoxicação das espécies ativas do oxigênio (EAO) envolve um mecanismo de elevada sincronia e que atua de forma altamente cooperativa. A regulação do sistema de defesa antioxidante enzimático depende principalmente de seu substrato (radicais livres e espécies ativas do oxigênio), da produção de co-substratos e da afinidade, seletividade e especificidade por esse substrato.¹³⁷

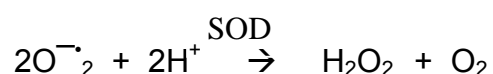
Além disso, a ação dos mesmos varia de acordo com a etapa do fenômeno oxidante, ou seja, se a neutralização ocorrer na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação, havendo a formação de produtos menos tóxicos, a substância é chamada *scavenger*.^{40, 59, 125} A substância pode, também, absorver

a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os. Nesse caso, é chamada de *quencher*.^{59, 125}

3.6.1 Superóxido dismutase (SOD)

Descoberta em 1969 por McCord e Fridovich, as SOD são metaloenzimas abundantes em células aeróbias e uma das mais importantes enzimas antioxidantes. Cabe a ela a dismutação do radical superóxido à peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como catalase ou glutathiona-peroxidase.¹⁵

Dessa forma, a SOD é capaz de aumentar 10^4 vezes a velocidade da reação de dismutação do radical superóxido à peróxido de hidrogênio em pH fisiológico, conforme a reação abaixo:



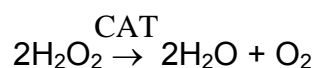
Em células eucarióticas, há várias isoenzimas do tipo SOD, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em seus sítios ativos⁶²

A SOD está presente virtualmente em todas as células eucarióticas. Nas células animais, a maior parte da SOD está localizada no citosol; porém, um pouco está presente nos lisossomos, no núcleo e na mitocôndria. Sabe-se que existe uma especial concentração de SOD no fígado.^{54, 62, 138}

A especificidade da SOD para a reação com o superóxido vem sendo usada para provar o envolvimento desse radical nos sistemas biológicos; porém, a SOD pode reagir diretamente com algumas EAO e EAN (radical hidroxila, *peroxyl*, radical *alkoxyl* e oxigênio *singlet*). Ponto semelhante aplica-se a outras enzimas antioxidantes, como a catalase.⁵³

3.6.2 Catalase (CAT)

A enzima catalase é uma ferriemoenzima, cuja função principal é dismutar peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular,⁶² conforme a reação:



A conversão do peróxido de hidrogênio, a água e o oxigênio molecular requerem a presença de NADPH para que esse ative os tetrâmeros da enzima. A principal fonte de NADPH é a reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a primeira reação da via das pentoses.¹³⁹

Em animais, a catalase está presente em todos os órgãos principais do corpo, principalmente o fígado. A atividade de catalase em animais encontra-se em organelas subcelulares unidas por uma membrana conhecida por peroxissoma. A mitocôndria e o retículo endoplasmático contêm pouca ou nenhuma catalase.⁵⁴ Em células eucarióticas, duas catalases: uma citosólica e uma perioxossomal, foram identificadas.¹⁴⁰ Por não possuírem peroxissomas, alguns órgãos estão mais expostos aos danos provocados pela produção de espécies reativas de oxigênio, como o coração, os pulmões e o cérebro.

Nesses órgãos, como num mecanismo de defesa, pode ocorrer a difusão de peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a Cat eritrocitária (os eritrócitos podem proteger outros tecidos contra o dano oxidativo pela “absorção” do peróxido de hidrogênio).

A enzima eritrocitária é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de metila e etila. A atividade de catalase apresenta um K_m bem maior que o da glutathione peroxidase (GPx) para o peróxido de hidrogênio, o que implica na destoxicação de H_2O_2 quando sua concentração é elevada, enquanto a glutathione-peroxidase atua em baixas concentrações do mesmo.⁵⁴

2.6.3 Glutathiona-peroxidase (GPx)

Outra defesa antioxidante é da família das peroxidases, e em mamíferos as principais peroxidases são as glutathiona-dependentes. A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima largamente distribuída nos tecidos animais com uma concentração especialmente alta no fígado.⁵⁴ O fígado contém altas concentrações de catalase e GPx; porém, a catalase está quase totalmente nos peroxissomos, enquanto a GPx é encontrada principalmente no citosol e apenas 10% na matriz mitocondrial.⁵⁴ Essa compartimentalização afeta obviamente os mecanismos de remoção do peróxido de hidrogênio *in vivo*. Na mitocôndria de mamíferos, é a principal defesa contra H₂O₂, já que essas organelas de maneira geral não apresentam catalase.¹³⁷

Portanto, o peróxido de hidrogênio produzido pelas enzimas dos peroxissomos é amplamente dismutada pela catalase presente em grande quantidade nessas organelas; por outro lado, o peróxido de hidrogênio originado das mitocôndrias, do retículo endoplasmático ou das enzimas do citosol (como a SOD) é manejado pelo GPx.⁵⁴ Parece que o sistema GPx apresenta alta capacidade de lidar com o peróxido de hidrogênio no fígado, ao contrário do que ocorre no pulmão, nos olhos e nos músculos, porém quando existem baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. Quando existem altas concentrações, entra em ação o sistema da CAT para remoção do peróxido de hidrogênio.⁵⁴

A maioria dos tecidos animais contém quantidades substanciais de GPx e catalase,⁵⁴ e as duas atuam de forma sincrônica na dismutação do peróxido de hidrogênio. Como referido anteriormente, pelo fato de a atividade de catalase apresentar um K_m bem maior do que o da glutathiona peroxidase (GPx) para o peróxido de hidrogênio, a glutathiona-peroxidase atua em baixas concentrações do mesmo, enquanto as catalases atuam em altas concentrações de peróxido de hidrogênio. Em concentrações menores de peróxido de hidrogênio, a GPx é a primeira enzima a atuar; porém, quando as quantidades de peróxido de hidrogênio elevam a catalase, torna-se mais importante na dismutação dessa

EAO.⁵⁴ Dessa forma, conclui-se que a CAT modula mais tardiamente que a SOD pela interferência da ação inicial da GPx.

3.7 Apoptose/necrose e isquemia-reperfusão hepática

Duas formas distintas de morte celular são reconhecidas:

a) a necrose, que é a morte celular que ocorre após lesão tissular extensa, devido a agentes químicos e físicos, que promovem rápido colapso da homeostase interna. É acompanhada de lise da membrana celular e das endomembranas com liberação de restos da célula para a matriz extracelular.¹⁴¹ A necrose ou necrose oncótica é tipicamente consequência de uma perturbação aguda do metabolismo, como ocorre na isquemia e reperfusão ou na hepatotoxicidade aguda induzida por drogas.¹²³

b) a apoptose, conceito proposto há 34 anos por Kerr e col.¹⁴² é a morte celular desencadeada por vários tipos de mecanismos, visando a eliminar células desnecessárias, excessivas, ou não desejáveis pelo organismo. A apoptose é freqüentemente iniciada por um estímulo específico¹⁴² que leva à ativação da cascata das cisteíno-aspartato proteases, conhecidas como caspases, as quais quebram proteínas celulares para levar à formação de corpos apoptóticos.

As alterações que antecedem à necrose são caracterizadas por edema celular e vacuolização de certos sítios, como o retículo endoplasmático granular (REG) e liso (REL); edema da zona apical da célula que, eventualmente, resultará em *blebs* superficiais (pequenas protruções da membrana); aumento da densidade eletrônica da matriz mitocondrial. Essas alterações correspondem à fase reversível de uma lesão devida, p.ex.: a isquemia. Segue-se o *inchaço* acentuado das mitocôndrias, o aparecimento de densidades amorfas (ou floculentas) nas mitocôndrias, a ruptura das membranas e a dissolução da estrutura organizada.

Isso resulta na perda da regulação osmótica com colapso da homeostasia celular, levando à morte celular dentro de um processo que hoje é denominado necrose. A digestão do DNA, e também do RNA, é tardia, por ação de enzimas lisossômicas. Essa ação degrada até a lise avançada, além do núcleo, também os elementos do citoplasma.¹⁴³

A apoptose é caracterizada pela diminuição do tamanho celular e pela condensação do núcleo. A condensação da cromatina na periferia do núcleo é consequência do colapso da cromatina, resultante do descolamento das alças cromossômicas¹⁴⁴ da lâmina nuclear, que se desintegra na apoptose. A lâmina nuclear é arcabouço de filamentos intermediários, as *laminas*, que ficam aderidas à membrana nuclear interna. A fragmentação do núcleo e a condensação da cromatina são modificações precoces da fase da apoptose morfológicamente explícita. Nessa etapa, a membrana celular e as endomembranas estão preservadas. As células não se coram no teste de exclusão pelo *azul de tripan*. Nesse teste, o corante não atravessa a membrana intacta da célula não lesada. Cora apenas as células mortas. Os conteúdos nuclear e citoplasmático se fragmentam no final do processo, originando os corpos apoptóticos. Esses restos são fagocitados ou por células vizinhas da mesma espécie, ou por macrófagos. Não ocorre reação inflamatória. Nos focos inflamatórios, os macrófagos reconhecem os neutrófilos que vão entrar em apoptose, e os fagocitam, graças a um receptor superficial da superfície do macrófago, a vitronectina.¹⁴³

Apesar de ter sido considerado em estudos prévios que as células apoptóticas manifestavam cromatina condensada e mitocôndrias intactas, atualmente muitas evidências sugerem que alterações das mitocôndrias, tais como edema, megamitocôndrias e rompimento da membrana externa mitocondrial são constantes em muitos modelos apoptóticos.^{145, 146}

Após a isquemia e reperfusão hepática *in vivo*, tanto a apoptose quanto a necrose são descritas como formas de morte celular.⁴³ Embora a necrose tem sido descrita com forma predominante de morte após lesão celular severa e

importantes perturbações do meio ambiente celular, a morte celular com muitas características de apoptose parece também ocorrer nessas situações. Atualmente, tem-se defendido o conceito de que ambos os processos de morte celular podem coexistir no mesmo tecido, e que, elementos dos dois processos podem ocorrer na mesma célula. Uma complexa interação entre a magnitude e a duração da lesão determina a maneira da morte celular.¹⁴⁷ Portanto, saber se a necrose ou a apoptose predomina e ocorre em uma célula pode depender de fatores intrínsecos, ou seja: tipo celular, estado de desenvolvimento da célula, ATP, ou extrínsecos, isto é: natureza e severidade da lesão, intervenções farmacológicas.

Além disso, a necrose e apoptose podem ocorrer em paralelo, e o bloqueio de uma via pode levar à morte celular pela via alternativa,¹⁴⁸ bem como ambas as vias de morte celular podem dividir mediadores comuns, o que dificulta ainda mais a distinção entre necrose e apoptose.

Dessa forma, Lemasters introduziu o termo necroapoptose para estas formas indistinguíveis de morte celular. A morte celular pura, através da necrose ou apoptose, pode representar, portanto, extremos em um amplo espectro da resposta celular fatal.^{43, 147}

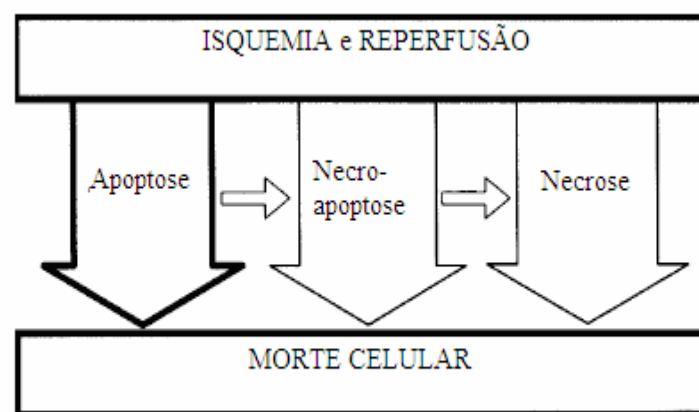


Figura 6: Representa evidências demonstrando tanto a apoptose quanto a necrose como modo de morte celular após isquemia e reperfusão hepática. Nesse contexto, parece que ambas as formas de morte celular coexistem ou

ocorrem em seqüência. Esse conceito, definido como necroapoptose, foi proposto recentemente por Lemasters¹⁴⁷ (Figura adaptada de: Selzner 2003)¹³

3.8 Caspase e isquemia-reperfusão hepática

O conhecimento das moléculas e vias envolvidas na apoptose está apenas emergindo. A quantificação da apoptose nos tecidos tem sido baseada no método TUNEL.¹⁴⁹⁻¹⁵² Entretanto, a via de sinalização para a apoptose mais investigada atualmente é a da cascata das caspases. De fato, o grupo de proteases, atualmente designado caspases, é fundamental na ativação e implementação do processo apoptótico. A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações estruturais que caracterizam a apoptose, como: desmonte da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas; hipercondensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Essas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação dessas caspases representa uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer e que a ativação destas é uma característica marcante da apoptose.^{153, 154}

Em humanos, pelo menos sete dos atualmente conhecidos treze membros da família das caspases participam em um de dois caminhos de sinalização: 1) a ativação de citocinas pró-inflamatórias; 2) a promoção da morte celular por apoptose. As caspases 1, e talvez as caspases 4 e 5, estão primariamente envolvidas na ativação de pró-citocinas. Outras caspases, principalmente as 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 são consideradas promotoras de apoptose; porém, não são as únicas enzimas que participam da apoptose. Nucleases e quinases protéicas também podem participar do processo.¹⁴³

As caspases envolvidas na via da morte celular por apoptose, por sua vez, são classificadas em iniciadoras e executoras. As caspases 8, 9 e 10 atuam na parte alta (*upstream* ou à montante) da cascata de eventos que levam à morte

celular, sendo portanto moléculas iniciadoras, e as caspases 6, 3 e 7, nessa ordem, atuam na fase de execução. A caspase 6 atua na clivagem das lâminas que levam ao fenótipo nuclear típico da apoptose e ainda na proteólise de queratinas. A caspase 3, bem-estudada, atua na fase de execução e é em grande parte responsável pelo fenótipo estrutural típico da apoptose.^{143, 155, 156}

Nesse contexto, as caspases podem ser consideradas um importante alvo terapêutico das lesões de isquemia e reperfusão hepática. O envolvimento das diferentes caspases, tanto iniciadoras (8 e 10) quanto executoras (3 e 7) da morte celular oferece oportunidade para intervenção nestas vias de duas maneiras, ou seja, através da supressão da ativação ou através da inibição da sua atividade. A supressão da caspase 8/10 por métodos farmacológicos e genéticos reduziu a morte das células hepáticas em vários modelos,¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ bem como a inibição das caspases executoras 3/7 também previniu a morte celular pela apoptose em muitos modelos celulares. Entretanto, essas caspases são ativadas após a lesão mitocondrial; conseqüentemente, a apoptose prevenida pela inibição da caspase 3/7 pode apenas ser substituída por outro fenótipo de morte celular.⁴³

Alguns autores têm demonstrado que o condicionamento isquêmico confere proteção contra a isquemia prolongada pela inibição da apoptose, através da *down-regulation* da atividade da caspase 3.^{161, 162}

Yadav e col.¹⁶¹ mais especificamente, demonstraram em fígado de ratos, submetidos a 90 min de isquemia e 60 minutos de reperfusão, que a atividade da caspase 3 foi três vezes maior nos controles do que no grupo condicionado.

Estudos envolvendo a via do NO têm também demonstrado que o NO apresenta efeito antiapoptótico, através da inibição da atividade das proteases da família das caspases (caspases 3, 8 e 9), por mecanismos dependentes da S-nitrosylation¹⁶³⁻¹⁶⁵ e da prevenção da liberação do citocromo c,¹⁶³ entre outros.

Com a finalidade de evitar a mudança no fenótipo da morte celular, uma vez ativadas as caspases executoras, a utilização dos inibidores globais (pancaspase inibidores) os quais previnem a ativação de todas as caspases, bem como estratégias que tentam atenuar a ativação das caspases no início da cascata, tal como a neutralização dos receptores Fas e fator de necrose tumoral (TNF) alfa, parece estratégia promissora.¹⁶⁹

A ativação de mediadores apoptóticos tem sido documentada na isquemia normotérmica, principalmente após a reperfusão.^{148-151, 170-173} A figura 7 ilustra uma seqüência de eventos do processo apoptótico, indicando aspectos conhecidos da atuação das caspases; porém, deve-se lembrar que existem variações desse esquema (ex.: as caspases que atuam à jusante, eventualmente, conforme o estímulo desencadeante da apoptose, podem atuar à montante). O balanço entre os mediadores pré e antiapoptóticos previne e regula a morte das células.^{170, 174} Na reperfusão, as células de Kupffer são ativadas,^{4, 175, 176} o que é evidenciado pelas mudanças estruturais¹⁷⁶ e pela formação de EAO,¹⁷⁷ pelo aumento da fagocitose e pela liberação de enzimas lisossomais¹⁴⁹ e várias citocinas incluindo TNF alfa.^{85, 178}

Quando essas citocinas ativam seus respectivos receptores ou mesmo pela liberação de EAO durante as fases iniciais da reperfusão, inicia a complexa cascata da apoptose. O sinal apoptótico é transferido para dentro da célula, onde a caspase 8 é ativada. Essa ativação inicial é seguida pela ativação da cascata de várias outras proteases e de outros eventos celulares. Primeiramente, a proteína Bid é ativada e resulta na liberação do citocromo c pela mitocôndria, que ativa o fator APAF-1.^{179, 180} Este, por sua vez, ativa a caspase 9 e, subseqüentemente, a caspase 3.¹⁸¹ Esse processo leva à fragmentação do DNA e morte celular. A mitocôndria atua, então, como um amplificador do sinal, permitindo que mesmo sinais fracos tenham efeitos lesivos importantes.¹⁸¹

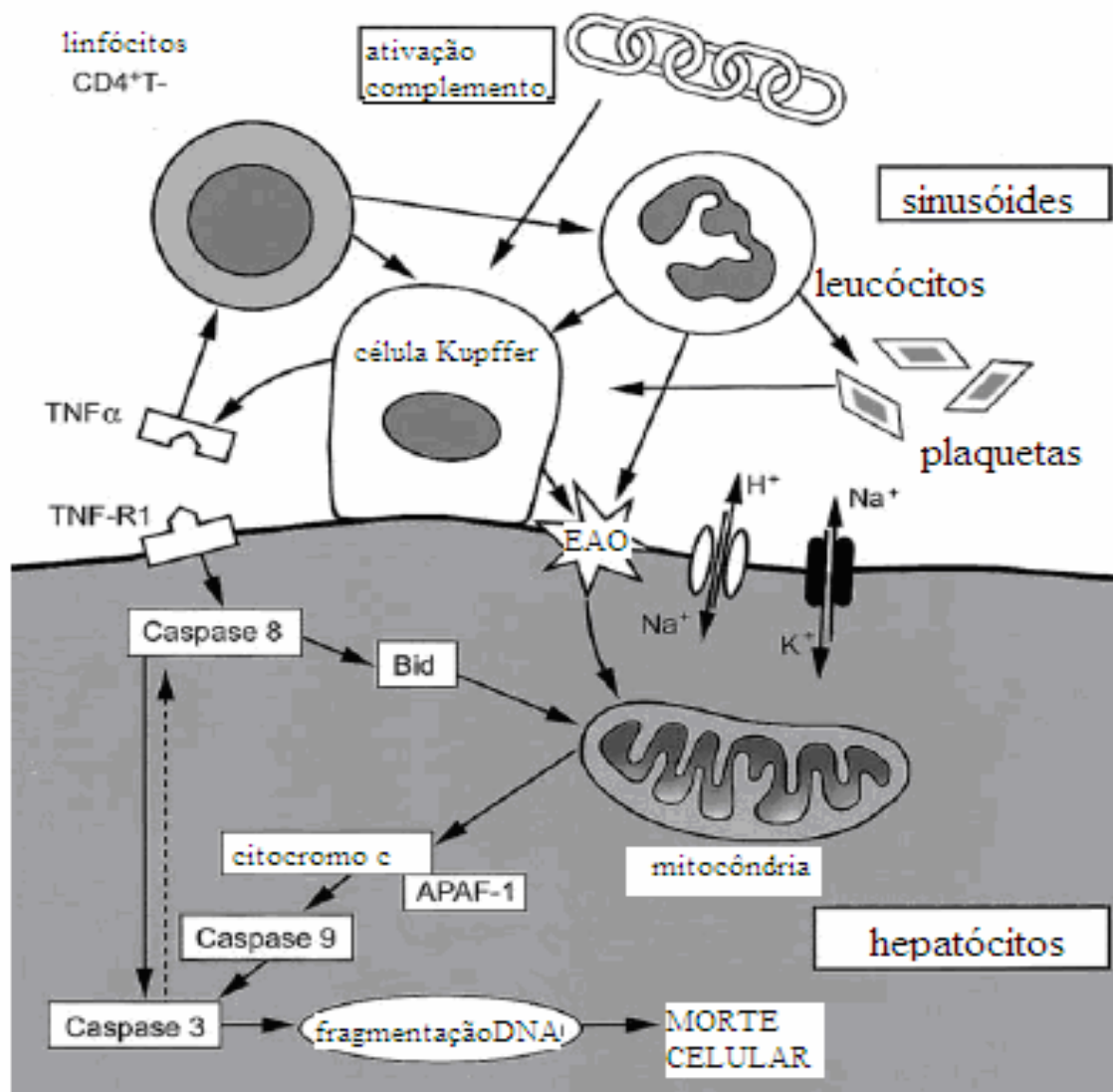


Figura 7: Representa os mecanismos da lesão de isquemia e reperfusão hepática normotérmica. As vias mais importantes incluem a ativação do TNF-alfa, como mediador da apoptose, alteração na distribuição de íons e geração de espécies reativas de oxigênio (EAO). O acúmulo de sódio intracelular é causado pela combinação do bloqueio da bomba sódio/potássio ATPase e a ativação do influxo de sódio pelo Na/H exchanger. (Figura adaptada de: Selzner 2003)¹³

3.9 Mitocôndrias e isquemia-reperfusão hepática

A lesão de isquemia e reperfusão hepática não induz apenas a prejuízo metabólico, mas também a alterações morfológicas nas células hepáticas demonstradas tanto na microscopia óptica quanto na microscopia eletrônica.^{25, 182-184} Mediante microscopia eletrônica, observam-se alterações nas células não parenquimatosas (edema das células dos sinusóides hepáticos e alargamento do espaço de Disse), bem como das células do parênquima hepático (edema das mitocôndrias, vacuolização e degeneração do citoplasma).¹⁸⁴

Atualmente, muitas evidências também sugerem que alterações das mitocôndrias, tais como edema, megamitocôndrias e rompimento da membrana externa mitocondrial são constantes em muitos modelos apoptóticos.^{145, 146} As mitocôndrias são de fato um alvo importante da lesão de isquemia e reperfusão, e parece ser a maior fonte intracelular de EAO, bem como a organela mais afetada por estas e sua disfunção torna-se importante fator patogênico.^{185, 186}

Embora as células de Kupffer e os neutrófilos são fontes de estresse oxidativo na microvascularização, ou seja, no espaço extracelular, a formação de EAO altamente permeáveis (tais como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso), na proximidade dos hepatócitos e células endoteliais, resulta em estresse oxidativo intracelular nessas células.^{187, 188}

Estudos prévios usando peróxidos como modelo oxidante mostraram que esses peróxidos causam disfunção mitocondrial, e levam secundariamente a estresse oxidativo mitocondrial em células-alvo.^{189, 190} A seqüência de eventos após a exposição desses oxidantes extracelulares inclui a oxidação de *pyridine nucleotides*, aumento do cálcio citosólico com entrada do cálcio dentro da mitocôndria e formação de EAO pela mitocôndria.^{189, 190} Estes eventos ativam o aparecimento da transição da permeabilidade mitocondrial⁴⁶, que resulta em perda do potencial de membrana através da membrana mitocondrial interna e edema mitocondrial,^{189, 190} resultando na inibição da síntese de ATP⁴⁶ e liberação de fatores apoptogênicos.¹⁹¹ Esses fatores pró-apoptogênicos claramente

incluem o citocromo c,¹⁹²⁻¹⁹⁷ e podem incluir protease(s),¹⁹⁴ aquela(s) da família das caspases.¹⁹⁸

Analisando os fatores mitocondriais necessários para induzir a ativação da caspase 3 em células destinadas à morte por apoptose, foi constatado que um dos fatores essenciais, para a degradação proteolítica das células, era a presença de citocromo c no citosol.² Em células estimuladas a entrar em apoptose ocorre liberação precoce de citocromo c para o citosol e diminuição dessa substância nas mitocôndrias.¹⁹⁶ Além disso, autores têm encontrado que o grau de edema induzido pela transição da permeabilidade mitocondrial (MPT), em mitocôndrias de fígado de ratos, correlaciona-se com a quantidade de citocromo c e adenilato kinase liberada.^{191, 199}

A ocorrência da MPT implica a abertura de um grande canal (poros) na membrana mitocondrial interna, que provoca a dissipação dos gradientes de cátions H^+ e conseqüente edema do compartimento mitocondrial interno, devido à alta concentração de solutos da matriz mitocondrial.¹⁹¹ Esses poros atravessam as membranas interna e externa da mitocôndria, os quais resultam na liberação direta do conteúdo encontrado no espaço intermembrana.

A permeabilidade desses poros pode ser induzida por uma série de condições, mais notavelmente pelo aumento significativo do Ca^{2+} na matriz induzida pela lesão de isquemia e reperfusão. Uma vez que ocorra aumento na permeabilidade, forças osmóticas induzem a entrada de água dentro da matriz, o que resulta em edema e, em última análise, na ruptura da membrana externa da mitocôndria.²⁰⁰ Saber se os níveis de edema requeridos para a liberação de fatores apoptogênicos são detectados pelas técnicas correntes requer ainda resolução, e o grau de edema requerido para a liberação de fatores apoptogênicos permanece desconhecido, sendo um campo interessante para pesquisa.¹⁹¹

Além das alterações na MPT, a sinalização da apoptose pode também resultar na exclusiva permeabilidade de poros especiais na membrana mitocondrial

externa, esta, por sua vez, representa uma via independente de edema e permite a liberação de proteínas localizadas no espaço intermembrana, incluindo citocromo c, para o citosol.^{143, 191}

Portanto, as alterações mitocondriais são precoces e essenciais para a concretização do processo apoptótico. Em estudos prévios, foi considerado que as células apoptóticas manifestavam cromatina condensada e mitocôndrias intactas; porém, atualmente, muitas evidências também sugerem que alterações das mitocôndrias, tais como: edema, megamitocôndrias e rompimento da membrana externa mitocondrial são constantes em muitos modelos apoptóticos.^{145, 146} Esses mecanismos operam antes mesmo do aparecimento das alterações estruturais típicas da apoptose: condensação da cromatina, clivagem do DNA, degradação proteolítica de estruturas nucleares e citoplasmáticas, redução do volume celular.^{143, 191}

É razoável propor que a transição da permeabilidade é responsável pela liberação de mediadores apoptogênicos em uma grande variedade de condições patológicas que envolvem a morte por apoptose, incluindo a lesão por isquemia e reperfusão. O mecanismo pelo qual há mais evidência desse fenômeno é o edema mitocondrial induzido pela MPT; porém, existe a possibilidade de que a transição da permeabilidade induz à liberação de mediadores pró-apoptóticos sem grande ocorrência de edema mitocondrial.

Uma segunda possibilidade, para ser implicada como mecanismo dessa liberação de mediadores, baseia-se no fato de que a sinalização da apoptose resulta também em exclusiva permeabilização de canais exclusivos na membrana mitocondrial externa (poros), que representa uma via independente da presença de edema, permitindo a liberação de substâncias específicas ou não específicas presentes no espaço intermembrana. Dados da literatura demonstram que a transição da permeabilidade está envolvida na liberação de mediadores apoptogênicos e na morte celular, tanto por necrose quanto por apoptose.¹⁹¹



Figura 8: Poros da transição da permeabilidade (PTP) mitocondrial. Os poros atravessam as membranas interna da mitocôndria e membrana externa da mitocôndria ⁵², os quais levam à direta liberação de substâncias do espaço intermembrana. A liberação do citocromo c pode então estimular a atividade da caspase no citoplasma. (Figura adaptada de: Murphy AN. 1999)¹⁹¹

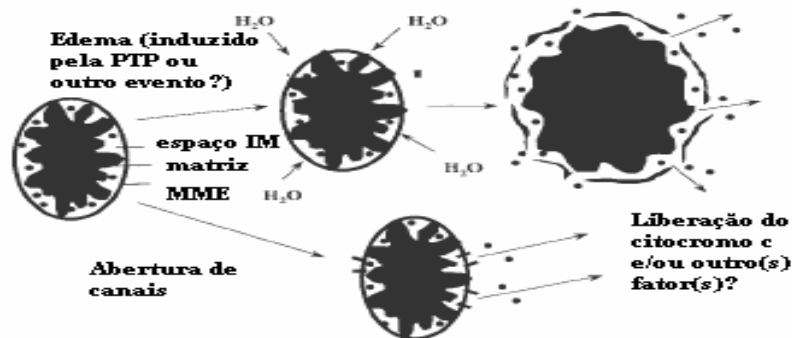


Figura 9: Mecanismos potenciais para a liberação de pró-apoptóticos. A via superior envolve o processo de liberação de fatores apoptogênicos mediados pelo edema mitocondrial, que pode ser induzido tanto pela MPT quanto por outros eventos que alteram a permeabilidade. Uma vez que a permeabilidade da membrana mitocondrial interna é comprometida, forças osmóticas induzem a um aumento do volume da matriz e, conseqüentemente, leva à ruptura da membrana mitocondrial externa (MME). A via inferior representa uma via independente de edema mitocondrial, pois envolve a abertura de canais específicos na MME, permitindo a liberação de substâncias do espaço intermembrana (IM). PTP: *permeability transition pore*. (Figura adaptada de: Murphy AN. 1999) ¹⁹¹

3.10 Precondicionamento isquêmico e isquemia-reperfusão hepática

O condicionamento isquêmico (PCI) consiste na aplicação de um breve período de isquemia seguido por um curto intervalo de reperfusão para submeter o órgão a um segundo período de isquemia mais prolongado.²⁰¹ Durante a cirurgia, o fluxo sanguíneo hepático aferente é ocluído pela colocação de pinças vasculares ao redor da tríade portal (manobra de *Pringle*),³ levando o órgão à isquemia global.

Após um período de 10-15 minutos de isquemia, a pinça vascular é removida, e o órgão é reperfundido por 10-15 minutos antes da nova isquemia mais prolongada. A proteção do condicionamento isquêmico parece estar baseada na ativação de mecanismos intrínsecos de defesa, decorrente dessa curta isquemia, adaptando o órgão para um subsequente insulto isquêmico mais prolongado.^{42, 162}

O condicionamento isquêmico age em dois momentos distintos: na chamada fase precoce, que ocorre logo após o estímulo e dura 2-3 horas,²⁰² na segunda fase, ou segunda janela de proteção (SWOP – *second window of protection*) desenvolve-se em 12-24 horas após o estímulo inicial²⁰³ e permanece com a proteção por 48-96 horas.²⁰² Entretanto, a magnitude da proteção é menor, e diferentes vias são responsáveis.²⁰⁴ Portanto, o condicionamento isquêmico induz a uma proteção bifásica contra a lesão de isquemia e reperfusão; um estímulo inicial de proteção forte que é curto, e um estímulo tardio, menos potente, porém mais prolongado (Figura 10). Repetidos episódios de condicionamento isquêmico não parecem ser aditivos nem cumulativos.^{205, 206}

O fenômeno do condicionamento isquêmico foi inicialmente descoberto no músculo cardíaco por Murry e cols. em 1986.²⁰⁷ Esses autores descreveram que breves períodos de isquemia miocárdica poderiam resultar em resistência do músculo cardíaco a subsequentes períodos de isquemia, demonstrando que o volume de infarto miocárdico induzido fora 70% menor nos animais condicionados, se comparados com os controles. Esse experimento realizado

em cães foi rapidamente reproduzido em outros modelos animais e em diferentes órgãos, configurando o conceito do condicionamento isquêmico.²⁰⁸ Dessa forma, subseqüentes efeitos benéficos foram demonstrados em vários tecidos, incluindo músculo esquelético,²⁰⁹ cérebro,²¹⁰ medula,²¹¹ rim,¹⁷⁶ retina,²¹² pulmão,²¹³ intestino²¹⁴ e fígado.^{34, 161, 215-217}

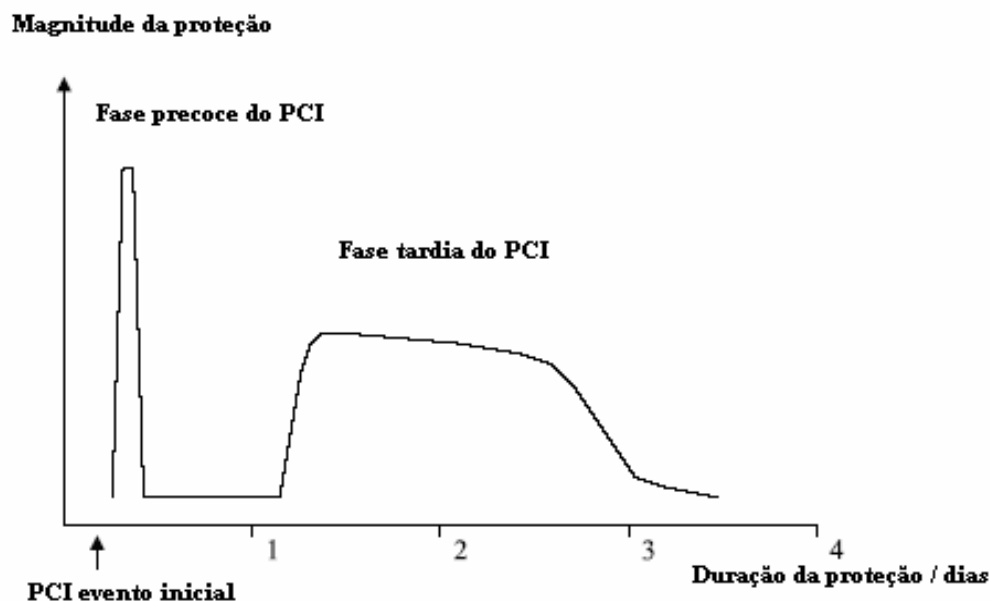


Figura 10: Proteção bifásica induzida por um episódio de condicionamento isquêmico. (Figura adaptada de: Pasupathy S. 2005)²⁰⁶

Em 1993 foram os primeiros a demonstrar que o condicionamento isquêmico por 5 minutos, seguido de 10 minutos de reperfusão, demonstrou melhor sobrevida e diminuição das enzimas hepáticas em um modelo experimental de 90 minutos de isquemia normotérmica em fígado de ratos.

Hardy e cols.²¹⁵ demonstraram uma melhor sobrevida em ratos submetidos à ressecção hepática com 45 minutos de isquemia previamente condicionados com 5 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão. Da mesma forma, Yoshizumi e cols.²¹⁸ demonstraram melhor sobrevida e aumento do ATP tecidual, após ressecção hepática em fígado de ratos submetidos a um condicionamento isquêmico. O efeito do condicionamento isquêmico foi,

de fato, reproduzido em vários modelos *in vivo* de isquemia hepática parcial ou global, principalmente em ratos^{24, 161, 201, 215-229} e em alguns poucos estudos em animais de grande porte^{35, 230-233} e também em humanos.^{34, 234, 235}

Esses estudos têm demonstrado que o condicionamento isquêmico no fígado (através da isquemia normotérmica) resulta em diminuição da lesão hepatocelular;^{201, 221} aumento tecidual de ATP;^{218, 224} decréscimo do fator de necrose tumoral alfa;^{201, 236} e liberação de interleucina-6 (IL-6);²³⁶ decréscimo das interações entre os leucócitos e as células endoteliais dos sinusóides;²²⁶ diminuição da lesão das células endoteliais;⁵⁰ aumento do fluxo sanguíneo hepático periférico;²³⁷ aumento da microcirculação hepática,^{238, 239} diminuição da apoptose hepatocelular, envolvendo mecanismos relacionados à atividade da caspase 3;¹⁶¹ preservação do metabolismo energético;²²¹ aumento da oxigenação hepática intra-celular;²⁴⁰ preservação da estrutura mitocondrial,^{162, 186} além de proteção a órgãos a distância.²²⁵

Apesar de a grande maioria dos estudos demonstrar evidências a favor da proteção do fígado contra as lesões de isquemia e reperfusão com o condicionamento isquêmico, tanto após isquemia fria quanto isquemia quente, existem alguns poucos estudos demonstrando que o condicionamento isquêmico no fígado pode resultar apenas em benefício limitado ou em nenhum benefício. Entre estes, Adam e cols.²⁴¹ sugeriram que o condicionamento isquêmico teve efeito nocivo na tolerância hepática à isquemia fria.

Schultz e cols.²⁴² em um modelo experimental em suínos, usando um protocolo de condicionamento isquêmico de 10 minutos seguido por 10 minutos de reperfusão (3 ciclos), antes de um período de 120 minutos de isquemia, demonstraram um aumento do fluxo biliar e ATP no grupo condicionado. Porém, o grau de necrose e apoptose não foi diferente em relação aos controles. Quando o período de isquemia foi aumentado para 200 minutos, o condicionamento isquêmico não demonstrou diferença em relação à

produção de bile, ATP e enzimas hepáticas em relação ao grupo-controle, e o grau de necrose e apoptose foi maior no grupo condicionado.

Rudiger e cols.²⁴³ observaram em camundongos que o condicionamento isquêmico resultou em melhor proteção das células hepáticas até 75 minutos de isquemia, perdendo o efeito protetor após 120 minutos de isquemia. Recentemente, Azulay e cols.²⁴⁴ em 2006, demonstraram que o condicionamento isquêmico não melhorou a tolerância hepática a isquemia e reperfusão após hepatectomia sob exclusão vascular total com preservação do fluxo cava.

Embora os benefícios do condicionamento isquêmico no fígado tenham sido de fato demonstrados na maioria dos modelos experimentais³⁵ e em estudos em humanos,^{34, 234, 235} o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos ainda permanecem obscuros.^{13, 35} A partir de estudos do condicionamento isquêmico no músculo cardíaco, tem sido aceito que o condicionamento isquêmico seja mediado por mecanismos de receptor-alvo.^{245, 246} Nesse contexto, vários mediadores têm sido propostos, incluindo a adenosina,^{201, 222 216, 226, 227, 239, 240, 247-249} o estresse oxidativo,^{249, 250} as proteínas do choque quente,^{229, 251} o fator de necrose tumoral alfa,²⁴⁹ modulação da cascata da apoptose,^{161, 219} tirosina kinases,²⁵² proteino kinases,²⁵³ entre outros. O condicionamento isquêmico está também associado com a ativação de elementos que podem ser nocivos (ex.: geração do estresse oxidativo e o próprio NO) e, dessa forma, esses efeitos podem sobrepujar em parte os efeitos benéficos do condicionamento isquêmico.

Nesse contexto, o condicionamento isquêmico, como um método não específico, pode não ser a estratégia mais efetiva, o que leva alguns autores a sugerirem que estudos deveriam se focar na descoberta de mecanismos celulares responsáveis pelo efeito protetor do condicionamento isquêmico, bem como na identificação de agentes farmacológicos, para interferir nos efeitos deletérios do condicionamento isquêmico. Esses agentes podem então ser

usados especificamente para induzir a proteção e, ao mesmo tempo, agir sobre os efeitos negativos do condicionamento isquêmico.¹⁷⁴

3.11 L-arginina e isquemia-reperfusão hepática

Recente estudo efetuado em centros de pesquisa tem voltado sua atenção, de forma especial, para uma melhor compreensão do óxido nítrico (NO) e de seus vários processos e eventos metabólicos, bem como fisiopatológicos.^{40, 88, 98, 100, 108, 117, 118} Destaca-se, nesse contexto, a possível participação do NO no fenômeno isquêmico-reperfusional, além da relação do mesmo com as EAO nos eventos patológicos que ocasionam a lesão de órgãos e tecidos envolvidos nesse processo.^{100, 117} No fígado, bem como em muitos outros órgãos, o NO tem muitas ações e fontes celulares.

O NO é produzido através da L-arginina por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS).³⁵ De maneira geral e simplificada, a atividade biológica do NO pode ser explicada mediante três mecanismos principais: 1) NO é eliminado pela reação com a oxihemoglobina, para dar origem à metahemoglobina e ao nitrato; 2) NO ativa a guanilato ciclase, dando origem à formação de guanosina monofosfatada cíclica (GMPc); 3) NO age como *scavenger* do radical superóxido ou transforma-se em peroxinitrito por sua reação com o referido EAO.^{40, 117}

Mais especificamente, entre os diversos potenciais efeitos benéficos do NO, no fenômeno de isquemia e reperfusão pode-se destacar a melhora da microcirculação, através de: 1) efeito vasodilatador que interfere na microcirculação após a reperfusão; 2) inibição da agregação plaquetária secundária ao aumento de GMPc, e assim impedindo a trombose vascular durante o período reperfusional; 3) bloqueio da aderência e migração monocitária; 4) inibição da ativação leucocitária que leva à adesão neutrofilica-endotelial e geração de EAO; 5) inibição da liberação de produtos com ação citotóxica e vasoconstritora (leucotrienos, citocinas e prostaglandinas); 6) ação

direta contra a expressão de moléculas de adesão celular e EAO.^{95, 96} Além disso, observa-se também efeito anti-apoptótico.²⁵⁴

A manipulação da bioatividade do NO através da sua inibição, ou de aumento em modelos experimentais, demonstra o papel importante do NO nas lesões de isquemia e reperfusão hepática.²⁵⁵⁻²⁶¹ Enquanto a administração de inibidores da óxido nítrico sintase aumenta a lesão em modelos animais de isquemia e reperfusão,^{257, 259-261} a administração de doadores de NO ou a suplementação com precursores do NO (tais como, a L-arginina), minimiza a lesão hepática de isquemia e reperfusão, melhorando a microcirculação.^{233, 255-257, 262-264}

Esses e outros estudos suportam o conceito de que existe uma deficiência na biodisponibilidade hepática do NO na fase precoce da reperfusão.²⁶⁵ Por outro lado, contrastando com a atividade citoprotetora, o NO pode ser também citotóxico, uma vez que reage com espécies reativas de oxigênio (superóxido), formando peroxinitrito.²⁶⁶⁻²⁶⁹ Esses eventos podem culminar na peroxidação lipídica, morte celular e lesão hepática.^{122, 269} A determinação do NO, como um citoprotetor e não como um agente citotóxico, em algumas circunstâncias clínicas, pode ser verificada pela ocorrência da apoptose, que é um importante processo no desenvolvimento da lesão de isquemia e reperfusão.²⁷⁰⁻²⁷²

Nesse contexto, estudos demonstram que o NO pode ter ambos os efeitos: pró-apoptótico ou antiapoptótico.^{273, 274} O NO ou seus bioprodutos podem promover a apoptose mediante múltiplos potenciais mecanismos, incluindo a indução da liberação de citocromo c, através da ativação da transição da permeabilidade mitocondrial, de lesão direta sobre o DNA ou mesmo através de vias que ativem as caspases.²⁷⁴

Por outro lado, recentes estudos também sugerem que o NO, mesmo em altos níveis, pode ter papel protetor contra a lesão do parênquima hepático, envolvendo vias antiapoptóticas associadas com caspases 3, 8 e 9,¹⁶³⁻¹⁶⁵ bem como bloqueando a MPT após a reperfusão, por via da GMPc,^{166,168} bem como

por vias associadas a *upregulation* do Bcl-2¹⁶⁷ e proteínas do choque quente (HSPs).¹⁶⁸

O NO no fígado parece também ter um importante papel na mediação do efeito do condicionamento isquêmico,²⁷⁵ associado com a diminuição da lesão tecidual, tanto na isquemia quente²¹⁶ quanto na isquemia fria²²⁷ em fígado de ratos. Peralta e cols.²⁷⁶ em vários experimentos, bloquearam receptores da adenosina com antagonistas específicos ou metabolizaram a adenosina endógena com a adenosina deaminase e observaram que, em ambos, o efeito protetor do condicionamento isquêmico foi abolido. Estes autores, demonstraram também, que os mecanismos pelos quais a adenosina confere proteção envolvem a indução da enzima NOS no fígado isquêmico.²²² Esses fatos indicam que o aumento dos níveis do NO em moderadas concentrações previnem lesão nos hepatócitos e nas células endoteliais.²⁶¹

Yin e cols.²²⁷ acreditam que o condicionamento isquêmico aumenta a resistência do fígado para a lesão de isquemia fria em ratos, pela estimulação do NO endógeno. Neste estudo, a estimulação farmacológica do NO (L-arginina) mimetizou, enquanto a inibição do NO antagonizou os efeitos protetores associados ao condicionamento isquêmico em fígado de ratos transplantados.

Koti e cols.²⁴⁰ recentemente demonstraram um aumento na oxigenação intracelular e um aumento na microcirculação hepática²³⁹ com o condicionamento isquêmico, os quais foram associados a um aumento dos níveis de NO. Portanto, os efeitos protetores do NO contra a isquemia e reperfusão hepática podem oferecer várias possibilidades para intervenções farmacológicas, incluindo agonistas dos receptores da adenosina (A2) e precursores do NO como a L-arginina²⁶¹ ou mesmo doadores do NO como FK409.²⁷⁷ Apesar de essas evidências atribuírem parte do efeito do condicionamento isquêmico à presença do NO, o link entre estes ainda é especulativo.³⁵

3.12 Modelos experimentais de isquemia-reperfusão hepática

A proteção do condicionamento isquêmico e do NO nas lesões de isquemia e reperfusão hepática de fato tem sido demonstrada; porém, a maioria dos estudos é em ratos,^{24, 161, 215-218, 221-224, 226-229, 236, 237, 243, 249, 276, 278-283} poucos estudos em animais de grande porte, tais como cães e suínos, e em humanos.^{12, 34, 35, 230, 232, 233, 235} No momento atual, o modelo experimental em ratos tem sido considerado o melhor modelo, por questões de logística, financeiras e éticas, além da disponibilidade de animais geneticamente definidos. Entretanto, devido à diferença de tamanho, variação da anatomia e ao rápido metabolismo, os resultados obtidos em pequenos animais podem ser extrapolados para humanos, porém com algumas limitações.²⁸⁴

Esses fatos têm sido documentados por alguns autores, especialmente na capacidade de tolerância do fígado à isquemia. Nesse contexto, tem-se demonstrado a habilidade de hepatócitos isolados, bem como de fígados normais *in vivo* tolerar a hipóxia/anóxia é espécie dependente. Caraceni e cols.²⁸⁵ observaram que, após 150 minutos de anóxia e 60 minutos de reoxigenação, somente 30% dos hepatócitos humanos isolados foram irreversivelmente lesados, enquanto 60% dos hepatócitos de ratos isolados demonstraram lesão irreversível.

Adicionalmente, outros autores demonstraram que, enquanto 40 minutos de isquemia normotérmica induziram à necrose hepática em ratos,²¹⁸ o fígado de humanos tolera até 85 minutos de isquemia normotérmica, sem sinais de lesão irreversível.²⁸⁶ Em suínos, em contraste com ratos, a tolerância hepática à isquemia normotérmica é similar a dos humanos.²⁸⁷

Além disso, tem-se descrito que a ocorrência do condicionamento isquêmico difere entre os diferentes tecidos dentro de uma determinada espécie e, no mesmo tecido, em diferentes espécies.^{109, 176, 207, 288, 289} Por ex.: dois estudos, um usando fígado de suínos,²⁹⁰ falharam em identificar o condicionamento renal.

Esses resultados diferem bastante dos resultados obtidos em pequenos animais.^{176, 288, 291-293}

Portanto, como em animais de grande porte, tais como cães e suínos existe maior similaridade na fisiologia e anatomia em relação aos humanos, estes parecem ser mais propícios para que se estudem problemas de relevância clínica.²⁸⁴ Além disso, como em humanos, informações dos efeitos do condicionamento isquêmico e da via da L-arginina/NO em suínos também é escassa.

4. JUSTIFICATIVA

A lesão de isquemia e reperfusão é uma importante causa de disfunção do fígado e ocorre após várias formas de choque, cirurgia hepática para trauma ou câncer, e no transplante de fígado.^{3, 35, 141, 294} Os mecanismos associados à lesão de isquemia e reperfusão ainda não estão totalmente esclarecidos; porém, esse processo parece ser decorrente de uma resposta inflamatória aguda e de uma disfunção microvascular, que leva, em última análise, à lesão celular irreversível.²⁹⁵ Algumas estratégias têm sido utilizadas para diminuir a lesão de isquemia e reperfusão na cirurgia hepática e no transplante. Entre estas, o condicionamento isquêmico³⁵ e a manipulação da bioatividade do óxido nítrico (NO) parecem ser promissores.^{256-261, 277}

A grande maioria dos estudos demonstra que o condicionamento isquêmico atua como protetor das lesões de isquemia e reperfusão;³⁵ porém, alguns autores têm verificado pouco ou nenhum benefício nesse método.²⁴¹⁻²⁴⁴ Além disso, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno são múltiplos e ainda incertos.^{35, 141} O condicionamento isquêmico têm sido descrito como um mecanismo endógeno de adaptação dos órgãos, em que moléculas liberadas durante a isquemia agem sobre receptores e contribuem para o efeito protetor. Vários mediadores benéficos foram propostos e têm sido investigados, incluindo o próprio óxido nítrico (NO),^{201, 216, 222, 227, 239, 240} o estresse oxidativo,^{249, 250} a modulação da cascata da apoptose, através da *down-regulation* das cisteíno proteases, conhecida como caspases e inibição da liberação do citocromo c das mitocôndrias,^{155, 161, 195, 296} entre outros.^{201, 222, 226, 229, 247, 248, 251-253, 297, 298}

O aumento da produção de ON no condicionamento isquêmico tem sido de fato demonstrado, e parece contribuir para o efeito protetor do

precondicionamento isquêmico.^{222, 224, 239, 240, 276, 299, 300} Peralta e cols. têm sugerido o NO como principal mediador do condicionamento isquêmico, tanto em fígados normais²²² quanto esteatóticos.²⁹⁹ Koti e cols. recentemente demonstraram a associação do NO com a melhora da oxigenação hepática²⁴⁰ e da microcirculação²³⁹ após o condicionamento isquêmico. Além disso, têm sido descrito que a geração do NO protetor, mediante condicionamento isquêmico, ocorre pela modulação da via da L-arginina/NOS.^{239, 240}

Recentemente, Koti e cols.²⁹⁴ observaram que tanto o condicionamento isquêmico quanto a L-arginina infundida antes da isquemia e reperfusão aumentaram os níveis de NOx (nitrito + nitrato) ($p < 0,05$) e atenuaram os níveis das enzimas hepáticas ($P < 0,05$) em relação ao grupo submetido à isquemia e reperfusão apenas. Esses autores observaram também que o condicionamento isquêmico foi associado à *up-regulation* da expressão da eNOS e com um aumento dos níveis da L-arginina. Concluíram que os efeitos da L-arginina foram similares aos observados no condicionamento isquêmico, e que o condicionamento isquêmico leva a um aumento na geração do NO citoprotetor derivado do aumento da expressão da eNOS e um aumento da L-arginina como substrato.

A manipulação direta da bioatividade do NO, através da sua inibição, ou do aumento em modelos experimentais, também demonstrou o papel do NO nas lesões de isquemia e reperfusão hepática.²⁵⁵⁻²⁶¹ Enquanto a administração de inibidores da NOS aumenta a lesão em modelos animais de isquemia e reperfusão,^{257, 259-261} a administração de doadores de NO, ou a suplementação com precursores do NO, tais como a L-arginina, minimiza a lesão hepática de isquemia e reperfusão, melhorando a microcirculação.^{108, 233, 255-258, 262, 263}

Estudos demonstram também que o NO pode ter efeito ambíguo, ou seja, pró-apoptótico ou antiapoptótico.²⁷⁴ O NO, ou seus bioprodutos, pode promover apoptose, através de múltiplos potenciais mecanismos, incluindo a indução da liberação de citocromo c, pela permeabilidade da membrana mitocondrial, de lesão direta sobre o DNA, ou mesmo através de vias que ativem as caspases.²⁷⁴

Por outro lado, recentes estudos também sugerem que o NO, mesmo em altos níveis, pode ter papel protetor contra a lesão do parênquima hepático, envolvendo vias antiapoptóticas associadas com caspases 3, 8 e 9.¹⁶³⁻¹⁶⁵

Embora os efeitos benéficos do condicionamento isquêmico e do NO nas lesões de isquemia e reperfusão hepáticas têm sido descritos, a caracterização dos múltiplos possíveis mediadores, nos diferentes processos da cascata do condicionamento, seja farmacológico (L-arginina) ou isquêmico, como evento-gatilho, como via bioquímica de ação e/ou como moléculas efetoras, não está definida, e as inter-relações desses processos ainda são controversas. Além disso, a atuação dessas estratégias terapêuticas sobre a atividade da caspase 3 e sobre as mudanças na ultra-estrutura mitocondrial é inconclusiva e raramente reportada em animais de grande porte, os quais apresentam maior potencial de compatibilização dos resultados com os humanos. Não obstante, o efeito da via da L-arginina/NO na lesão hepática de isquemia e reperfusão, além de complexo, é ainda controverso, podendo estar associado a ambos os efeitos: citoprotetor ou citotóxico.

Portanto, realizou-se um estudo para avaliar os efeitos benéficos, ou deletérios, do condicionamento isquêmico e do condicionamento farmacológico, através da infusão intraportal da L-arginina, na fase precoce da lesão de isquemia e reperfusão normotérmica em fígado de suínos, particularmente observando alterações na morfologia das células hepáticas, presença de apoptose/necrose e modificações na ultra-estrutura mitocondrial.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do condicionamento isquêmico e da infusão intraportal da L-arginina, substrato precursor da síntese de NO, na fase precoce da lesão de isquemia e reperfusão normotérmica hepática em suínos.

5.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito do condicionamento isquêmico hepático e da infusão ou não de L-arginina intraportal, na lesão hepatocelular, através da determinação da concentração sérica da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e produção de bile.

b) Avaliar o efeito do condicionamento isquêmico hepático e da infusão ou não de L-arginina intraportal na peroxidação lipídica, através da determinação das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

c) Avaliar o efeito do condicionamento isquêmico hepático e da infusão ou não de L-arginina intraportal sobre a atividade dos antioxidantes enzimáticos séricos superóxido dismutase e catalase.

d) Avaliar o efeito do condicionamento isquêmico hepático e da infusão ou não de L-arginina intraportal sobre as características histológicas do fígado de suínos.

e) Avaliar o efeito do condicionamento isquêmico hepático e da infusão ou não de L-arginina intraportal sobre o grau de apoptose de células do fígado de suínos através da atividade da caspase 3.

f) Avaliar o efeito do condicionamento isquêmico hepático e da infusão ou não de L-arginina intraportal sobre a ultra-estrutura mitocondrial de células do fígado de suínos através da microscopia eletrônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006;**79**(20): 1881-1894.
2. Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, Odselius R. Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Arch Surg* 1996;**131**(4): 442-447.
3. Giovanardi RO, Giovanardi HJ, Bozetti M, Garcia R, Lima LP. Intermittent total pedicular clamping in hepatic resections in non-cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 2002;**49**(45): 764-769.
4. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;**13**(1): 83-95.
5. Deschenes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Transplantation* 1998;**66**(3): 302-310.
6. Yamakawa Y, Takano M, Patel M, Tien N, Takada T, Bulkley GB. Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. *Ann Surg* 2000;**231**(3): 387-398.
7. Okano N, Miyoshi S, Owada R, Fujita N, Kadoi Y, Saito S, Goto F, Morita T. Impairment of hepatosplanchnic oxygenation and increase of serum hyaluronate during normothermic and mild hypothermic cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 2002;**95**(2): 278-286, table of contents.
8. Glantzounis GK, Tselepis AD, Tambaki AP, Trikalinos TA, Manataki AD, Galaris DA, Tsimoyiannis EC, Kappas AM. Laparoscopic surgery-induced

changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surg Endosc* 2001;**15**(11): 1315-1319.

9. Glantzounis GK, Tsimaris I, Tselepis AD, Thomas C, Galaris DA, Tsimoyiannis EC. Alterations in plasma oxidative stress markers after laparoscopic operations of the upper and lower abdomen. *Angiology* 2005;**56**(4): 459-465.

10. Kalil AN, Mastalir ET. Laparoscopic hepatectomy for benign liver tumors. *Hepatogastroenterology* 2002;**49**(45): 803-805.

11. Rezende-Neto JB, Moore EE, Masuno T, Moore PK, Johnson JL, Sheppard FR, Cunha-Melo JR, Silliman CC. The abdominal compartment syndrome as a second insult during systemic neutrophil priming provokes multiple organ injury. *Shock* 2003;**20**(4): 303-308.

12. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;**53**(5): 957-978.

13. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;**125**(3): 917-936.

14. Bulkley G, . The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983 Sep:407-411.

15. McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983;**94**(3): 412-414.

16. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;**107**(4): 526-545.

17. Nicolli A, costantini P, Basso E, Colonna R, Petronilli V, Bernardi P. Potential role of cyclosporin A-sensitive mitochondrial channels in ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1995;**27**(5): 2825-2826.

18. Miranda LEC VF, Ceneviva R, Evora PRB As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2004 jan./fev.:1-12.

19. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;**81**(5): 637-647.
20. Romanque U. PUM, Mario; Videla., Luis A. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el precondicionamiento isquémico / Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning *Revista médica de Chile* 2005:469-476.
21. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;**190**(3): 255-266.
22. Lemasters JJ, Thurman RG. The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* 1995;**108**(4): 1317-1320.
23. Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatogastroenterology* 1999;**46 Suppl 2**: 1482-1484.
24. 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;**36**(1): 94-102.
25. 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;**145**(6): 1421-1431.
26. Marzi I, Takei Y, Rucker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F, Kamada T. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 1994;**7 Suppl 1**: S503-506.
27. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb J* 1990;**4**(15): 3355-3359.
28. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998;**275**(6 Pt 1): G1341-1352.
29. Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, Strasberg SM. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993;**18**(3): 635-647.

30. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996;**270**(5 Pt 1): G798-803.
31. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996;**23**(3): 506-514.
32. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, Karahashi T, Kumamoto Y, Yoshida M, Kitajima M. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997;**64**(10): 1398-1403.
33. Cohen PJ. Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can J Anaesth* 1992;**39**(10): 1090-1093.
34. 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;**232**(2): 155-162.
35. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;**20**(5): 383-396.
36. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebag M, Adam R, Scatton O, Min BY, Delvard V, Lemoine A, Bismuth H, Castaing D. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg* 2005;**242**(1): 133-139.
37. GUYTON A. A célula e seu funcionamento. In: *Tratado de Fisiologia Médica*, Guanabara-Kogan (ed): Rio de Janeiro, 1991; 8-20, 654-661.
38. Lehninger A. Princípios de Bioquímica. In, Sanvier (ed): São Paulo, 1995; 16-354.
39. Mayes PH, HA; Rodwell, VW; Mayes, PA. Oxidación Biológica. In: *Manual de Química Fisiológica*, Moderno M (ed). 7: 7 ed México, 1980; 124-317.

40. Rhoden E, . Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico na isquemia e reperfusão normotérmica renal: estudo experimental em ratos. 2001:1-109. Tese de Doutorado em Medicina: Ciências Médicas.
41. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;**81**(1): 22-29.
42. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;**284**(1): G15-26.
43. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;**43**(2 Suppl 1): S31-44.
44. Dhar DK, Takemoto Y, Nagasue N, Uchida M, Ono T, Nakamura T. FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. *J Surg Res* 1996;**60**(1): 142-146.
45. Farber JL. The role of calcium in cell death. *Life Sci* 1981;**29**(13): 1289-1295.
46. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;**341** (Pt 2): 233-249.
47. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**304**(3): 463-470.
48. Nishimura Y, Lemasters JJ. Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ* 2001;**8**(8): 850-858.
49. Zahrebelski G, Nieminen AL, al-Ghoul K, Qian T, Herman B, Lemasters JJ. Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes: a laser scanning confocal microscopic study. *Hepatology* 1995;**21**(5): 1361-1372.
50. Ishii K, Suita S, Sumimoto H. Effect of verapamil on conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver. *Res Exp Med (Berl)* 1990;**190**(6): 389-399.

51. Churchill TA, Cheetham KM, Fuller BJ. Glycolysis and energy metabolism in rat liver during warm and cold ischemia: evidence of an activation of the regulatory enzyme phosphofructokinase. *Cryobiology* 1994;**31**(5): 441-452.
52. Baumann M, Bender E, Stommer G, Gross G, Brand K. Effects of warm and cold ischemia on mitochondrial functions in brain, liver and kidney. *Mol Cell Biochem* 1989;**87**(2): 137-145.
53. Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 1994;**14**(5): 234-240.
54. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in Biology and Medicine 3 ed Oxford: Oxford University Press* 2000.
55. Ambrosio G, Tritto I, Chiariello M. The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**(4): 1035-1039.
56. Rhoden CRD, F.M.;Lucas, M.L.:. Repercussões da inibição da produção de óxido nítrico no dno causado por radicais livres na síndrome de isquemia-reperusão em ratos. *Revista HCPA* 1998:77.
57. Rhoden EL. Efeitos do alopurinol na síndrome da isquemia e reperusão renal: estudo experimental em ratos. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 1997, 140 p. Dissertação de Mestrado-Curso de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica.
58. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;**119**(6): 598-620.
59. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980;**492**: 153-168.
60. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;**53**(1): 135-159.

61. Oga Z. Fundamentos de toxicologia. In, Atheneu (ed): São Paulo, 2003 39-44.
62. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998;**201**(Pt 8): 1203-1209.
63. Felipe Jr. & Percário S. Radicais livres em medicina intensiva. *Rev Bras Terap Intens* 1991:66-72
64. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993;**113**(5): 479-483.
65. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987;**46**(7): 2402-2406.
66. Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O₂⁻. in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;**263**(2 Pt 2): F251-255.
67. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery* 1983;**94**(3): 428-432.
68. Zager RA, Gmur DJ. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 1989;**257**(6 Pt 2): F953-958.
69. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1990;**171**(2): 120-125.
70. Karwinski W, Bolann B, Ulvik R, Farstad M, Soreide O. Normothermic liver ischemia in rats: xanthine oxidase is not the main source of oxygen free radicals. *Res Exp Med (Berl)* 1993;**193**(5): 275-283.
71. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 1995;**109**(1): 189-197.
72. Linas SL, Whittenburg D, Repine JE. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol* 1990;**258**(3 Pt 2): F711-716.
73. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;**55**(5): 662-675.

74. J. NDGFS. Bioenergetics 3 In, Express A (ed): San Diego, 2001; 127-129.
75. Nohl H, Gille L, Kozlov A, Staniek K. Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Rep* 2003;**8**(3): 135-141.
76. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998;**273**(18): 11038-11043.
77. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996;**328**(1): 85-92.
78. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 1999;**274**(44): 31185-31188.
79. Peres W. Radicais livres em níveis biológicos. In, EDUCAT (ed), 1995; 11-43.
80. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;**222**(1): 1-15.
81. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;**15**(7): 718-724.
82. Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999;**117**(1): 200-210.
83. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, Kontos N, Kostopoulou E, Papachrestou A, Tsantilas D, Spyridis C, Takoudas D, Botsoglou N, Dimitriadou A, Giakoustidis E. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg* 2002;**26**(7): 872-877.
84. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *Faseb J* 1999;**13**(1): 155-168.

85. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;**122**(1): 202-210.
86. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999;**77**(8): 577-592.
87. Jaeschke H. Xanthine oxidase-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: are we coming full circle after 20 years? *Hepatology* 2002;**36**(3): 761-763.
88. Mumtaz FH, Khan MA, Thompson CS, Morgan RJ, Mikhailidis DP. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implications. *BJU Int* 2000;**85**(5): 567-578.
89. Salazar FJ, Alberola A, Pinilla JM, Romero JC, Quesada T. Salt-induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibition. *Hypertension* 1993;**22**(1): 49-55.
90. Salazar FJ, Pinilla JM, Lopez F, Romero JC, Quesada T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992;**20**(1): 113-117.
91. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997;**63**(1): 277-284.
92. Rhoden EL, Rhoden CR, Lucas ML, Pereira-Lima L, Zettler C, Bello-Klein A. The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Immunol* 2002;**10**(4): 277-284.
93. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Schimmel MS, Eidelman AI, Branski D, Hochman A. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;**29**(1): 69-74.
94. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998;**30**(8): 4217-4223.

95. Bretan PN, Jr., Chang J, Lobo E, Dumitrescu O, Miller B, Yen TS. Experimental and clinical assessment of preservation-induced reperfusion injury comparing renal transplant blood flow and renal endothelin concentrations. *Transplant Proc* 1997;**29**(8): 3520-3521.
96. Subramanian S, Bowyer MW, Egan JC, Knolmayer TJ. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury with selectin inhibition in a rabbit model. *Am J Surg* 1999;**178**(6): 573-576.
97. Storck M, Krombach F, Prestel R, Hammer C, Abendroth D. Role of leukocyte adhesion molecules during ex vivo kidney xenoperfusion. *Transplant Proc* 1997;**29**(7): 3011-3012.
98. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;**329**(27): 2002-2012.
99. Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR, Jr., Simmons RL. Nitric oxide--a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993;**55**(6): 1205-1212.
100. Isobe M, Katsuramaki T, Kimura H, Matsuno T, Tarumi K, Yagihashi A, Sasaki K, Hirata K. Correlation between nitric oxide and endothelin after prolonged warm ischemia-reperfusion injury in pig livers. *Transplant Proc* 1998;**30**(7): 3750-3753.
101. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(16): 9220-9225.
102. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994;**267**(4 Pt 1): G562-568.
103. Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994;**267**(3 Pt 1): G416-422.
104. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000;**20**(1): 3-7.

105. Ming Z, Han C, Lauth WW. Nitric oxide mediates hepatic arterial vascular escape from norepinephrine-induced constriction. *Am J Physiol* 1999;**277**(6 Pt 1): G1200-1206.
106. Pannen BH. New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesth Analg* 2002;**94**(6): 1448-1457.
107. Waz WR, Van Liew JB, Feld LG. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998;**12**(1): 26-29.
108. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;**59**(6): 772-779.
109. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int* 2000;**85**(9): 1007-1013.
110. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**261**(3): 917-922.
111. Kimura H, Katsuramaki T, Isobe M, Nagayama M, Meguro M, Kukita K, Nui A, Hirata K. Role of inducible nitric oxide synthase in pig liver transplantation. *J Surg Res* 2003;**111**(1): 28-37.
112. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, Matsuno T, Nui A, Hirata K. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 2002;**73**(9): 1439-1446.
113. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;**181**(2): 160-166.
114. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock* 2002;**17**(4): 280-285.

115. Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1998;**10**(1): 20-25.
116. Hines IN, Kawachi S, Harada H, Pavlick KP, Hoffman JM, Bharwani S, Wolf RE, Grisham MB. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 2002;**234-235**(1-2): 229-237.
117. Demiryurek AT, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol Toxicol* 1998;**82**(3): 113-117.
118. Caramelo C, Espinosa G, Manzarbeitia F, Cernadas MR, Perez Tejerizo G, Tan D, Mosquera JR, Digiuni E, Monton M, Millas I, Hernando L, Casado S, Lopez-Farre A. Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits. *Circ Res* 1996;**79**(5): 1031-1038.
119. Doulias PT, Barbouti A, Galaris D, Ischiropoulos H. SIN-1-induced DNA damage in isolated human peripheral blood lymphocytes as assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay). *Free Radic Biol Med* 2001;**30**(6): 679-685.
120. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;**82**(1): 47-95.
121. Pawlak W, Kedziora J, Zolynski K, Kedziora-Kornatowska K, Blaszczyk J, Witkowski P, Zieleniewski J. Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. *J Gravit Physiol* 1998;**5**(1): P163-164.
122. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;**271**(5 Pt 1): C1424-1437.
123. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;**146**(1): 3-15.
124. Meneghini R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 1987:57-62.
125. Bello-Klein A. Contratura cardíaca induzida pelo peróxido de hidrogênio. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994. Tese de Doutorado em Fisiologia- Instituto de Biociências. :200.

126. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;**95**(2): 351-358.
127. Stein HJ, Oosthuizen MM, Hinder RA, Lamprechts H. Effect of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Surg* 1993;**165**(1): 96-100.
128. Ortolani O, Caggiano M, Mannelli R, Gogliettino A, Tufano R. Protection from ischemia-reperfusion damage in patients with stroke: the role of rutin and GSH. *Transplant Proc* 1995;**27**(5): 2877-2878.
129. Nunes FA, Kumar C, Chance B, Brass CA. Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. Mechanisms of free radical formation in the liver. *Dig Dis Sci* 1995;**40**(5): 1045-1053.
130. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;**9**(6): 515-540.
131. Willet K, Vaz de Macedo D, Detry O, Evens A, da Silva LP, Sluse FE. Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and in vitro. *Transplant Proc* 1995;**27**(5): 2827-2828.
132. MATIELI J. Tese de Doutorado: Radicais oxigênio livres na isquemia e reperfusão hepática: estudo experimental com a catalase. :63.
133. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;**312**(3): 159-163.
134. Moritake T, Tsuboi K, Anzai K, Ozawa T, Ando K, Nose T. ESR spin trapping of hydroxyl radicals in aqueous solution irradiated with high-LET carbon-ion beams. *Radiat Res* 2003;**159**(5): 670-675.
135. Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. [Antioxidants to slow aging, facts and perspectives]. *Presse Med* 2002;**31**(25): 1174-1184.
136. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987;**1**(6): 441-445.

137. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;**215**(2): 213-219.
138. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;**33**(3): 337-349.
139. Ursini MV, Parrella A, Rosa G, Salzano S, Martini G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem J* 1997;**323 (Pt 3)**: 801-806.
140. Spevak W, Hartig A, Meindl P, Ruis H. Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 1986;**203**(1): 73-78.
141. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 149-159.
142. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;**26**(4): 239-257.
143.
http://www.fm.usp.br/departamento/patologia/anatpatol/apostila_apoptose.php.
144. Oberhammer F, Bursch W, Tiefenbacher R, Froschl G, Pavelka M, Purchio T, Schulte-Hermann R. Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA. *Hepatology* 1993;**18**(5): 1238-1246.
Sci 2000;**25**(7): 319-324.
146. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 1999;**46**(2): 223-237.

147. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;**276**(1 Pt 1): G1-6.
148. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;**32**(6): 1280-1288.
149. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(6): 1652-1660.
150. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *Faseb J* 1999;**13**(2): 253-261.
151. Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1997;**3**(4): 407-415.
152. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000;**118**(1): 183-191.
153. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997;**276**(5318): 1571-1574.
154. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;**281**(5381): 1312-1316.
155. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;**9**(1): 35-49.
156. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 1998;**281**(5381): 1355-1357.

157. Natori S, Higuchi H, Contreras P, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 prevents caspase activation and apoptosis in sinusoidal endothelial cells during liver preservation injury. *Liver Transpl* 2003;**9**(3): 278-284.
158. Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony Thompson J, Eckhoff DE. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 2004;**136**(2): 390-400.
159. Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**308**(3): 1191-1196.
160. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Waltemathe M, Gosling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kuhnel F, Kubicka S. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(13): 7797-7802.
161. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;**30**(5): 1223-1231.
162. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002;**8**(11): 990-999.
163. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000;**32**(4 Pt 1): 770-778.
164. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res* 2002;**62**(6): 1648-1653.
165. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999;**284**(5414): 651-654.

166. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997;**272**(49): 31138-31148.
167. Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 1995;**95**(4): 1884-1890.
168. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997;**272**(2): 1402-1411.
169. Matsuki Y, Li L, Hsu HC, Yang PA, Zheng R, Edwards CK, 3rd, Chaudry IH, Zhang HG, Mountz JD. Soluble Fas gene therapy protects against Fas-mediated apoptosis of hepatocytes but not the lethal effects of Fas-induced TNF-alpha production by Kupffer cells. *Cell Death Differ* 2002;**9**(6): 626-635.
170. Selzner M, Rudiger HA, Selzner N, Thomas DW, Sindram D, Clavien PA. Transgenic mice overexpressing human Bcl-2 are resistant to hepatic ischemia and reperfusion. *J Hepatol* 2002;**36**(2): 218-225.
171. Yokoyama I, Hayashi S, Kobayashi T, Negita M, Namii Y, Katayama A, Nagasaka T, Koike C, Tachi Y, Hayakawa A, Tajiri H, Takagi H. Hepatocyte apoptosis and cytosolic calcium dynamics in ischemic injury. *Transplant Proc* 1997;**29**(8): 3514.
172. Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K, Tanaka N. Induction of apoptosis during the early phase of reperfusion after rat liver ischemia. *Acta Med Okayama* 1997;**51**(6): 305-312.
173. Tsuchiya T, Abe T, Saito T, Miyazawa M, Kanno H, Ishii S, Suzuki M, Inoue H, Motoki R. Induction of immediate early genes and apoptosis after ischemia/reperfusion in fatty liver rats. *Transplant Proc* 1998;**30**(7): 2919-2922.
174. Rudiger HA, Clavien PA. A cytotoxic drug against reperfusion injury? *Hepatology* 2000;**31**(2): 533-535.

175. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *Faseb J* 2001;**15**(7): 1230-1232.
176. Thurman R CK, Marzi I, Currin R, Lemasters J. . Functional activation of Kupffer cells by cold ischemic storage of rat liver in Euro-Collins solution. . *Hepatology* 1988:1824-1827.
177. Jaeschke H. Kupffer cell-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: does the controversy continue? *Hepatology* 1999;**30**(6): 1527-1528.
178. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;**85**(6): 1936-1943.
179. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;**91**(4): 479-489.
180. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;**94**(4): 491-501.
181. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;**17**(6): 1675-1687.
182. Rodriguez AA, LaMorte WW, Hanrahan LM, Hopkins SR, O'Keane JC, Cachecho R, Hirsch EF. Liver viability after ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 1991;**126**(6): 767-772.
183. Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;**56**(1): 24-31.
184. Man K, Lo CM, Liu CL, Zhang ZW, Lee TK, Ng IO, Fan ST, Wong J. Effects of the intermittent Pringle manoeuvre on hepatic gene expression and ultrastructure in a randomized clinical study. *Br J Surg* 2003;**90**(2): 183-189.
185. Hubbard WJ, Bland KI, Chaudry IH. The role of the mitochondrion in trauma and shock. *Shock* 2004;**22**(5): 395-402.

186. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock* 2005;**24**(4): 370-375.
187. Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* 1999;**29**(2): 443-450.
188. Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1999;**276**(5 Pt 1): G1137-1144.
189. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1997;**272**(4 Pt 1): C1286-1294.
190. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 1995;**307** (Pt 1): 99-106.
191. Murphy A. Potential Mechanisms of Mitochondrial Cytochrome-c Release During Apoptosis. *Drug dev res* 1999:18–25.
192. Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 1994;**79**(2): 353-364.
193. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;**86**(1): 147-157.
194. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;**183**(4): 1533-1544.
195. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;**275**(5303): 1129-1132.

196. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;**275**(5303): 1132-1136.
197. Ellerby HM, Martin SJ, Ellerby LM, Naiem SS, Rabizadeh S, Salvesen GS, Casiano CA, Cashman NR, Green DR, Bredesen DE. Establishment of a cell-free system of neuronal apoptosis: comparison of premitochondrial, mitochondrial, and postmitochondrial phases. *J Neurosci* 1997;**17**(16): 6165-6178.
198. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;**140**(6): 1485-1495.
199. Scarlett JL, Murphy MP. Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997;**418**(3): 282-286.
200. Halestrap AP. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1989;**973**(3): 355-382.
201. 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;**25**(4): 934-937.
202. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;**88**(3): 1264-1272.
203. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993;**72**(6): 1293-1299.
204. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000;**87**(11): 972-983.

205. Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, Hori M. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Am Coll Cardiol* 2002;**40**(4): 826-831.
206. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;**29**(2): 106-115.
207. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;**74**(5): 1124-1136.
208. Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol* 2000;**62**: 79-109.
209. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;**29**(6): 782-788.
210. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;**14**(4): 545-553.
211. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998;**27**(4): 720-725.
212. Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;**39**(5): 777-785.
213. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996;**15**(12): 1258-1267.
214. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**222**(1): 27-32.

215. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg* 1996;**66**(10): 707-710.
216. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;**229**(1): 264-270.
217. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;**25**(6): 3303-3304.
218. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;**85**(12): 1636-1640.
219. Peralta C, Perales JC, Bartrons R, Mitchell C, Gilgenkrantz H, Xaus C, Prats N, Fernandez L, Gelpi E, Panes J, Rosello-Catafau J. The combination of ischemic preconditioning and liver Bcl-2 overexpression is a suitable strategy to prevent liver and lung damage after hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 2002;**160**(6): 2111-2122.
220. Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Peralta C. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002;**36**(3): 562-572.
221. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;**279**(1): G163-171.
222. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. 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;**29**(1): 126-132.

223. 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;**28**(3): 768-773.
224. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001;**34**(6): 1164-1173.
225. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpi E, Rosello-Catafau J. 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;**33**(1): 100-113.
226. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG, Granger DN, McDonald JC. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;**69**(2): 300-303.
227. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;**66**(2): 152-157.
228. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999;**126**(5): 945-954.
229. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;**128**(3): 251-258.
230. Tsai BM, Wang M, March KL, Turrentine MW, Brown JW, Meldrum DR. Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 2004;**21**(3): 195-209.

231. Burra P, Chirizzi L, Cardin R, Cadrobbi R, Baldan N, Calabrese F, Pettenazzo E, Calo L, Plebani M, Rigotti P. Warm hepatic ischemia in pigs: effects of L-arginine and oligotide treatment. *J Invest Surg* 2001;**14**(6): 303-312.
232. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, Furukawa H, Starzl TE, Todo S. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999;**188**(1): 43-52.
233. Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, Okuhama Y, Kusano T, Muto Y. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;**69**(2): 429-434.
234. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;**238**(6): 843-850; discussion 851-842.
235. Nuzzo G, Giuliante F, Vellone M, De Cosmo G, Ardito F, Murazio M, D'Acapito F, Giovannini I. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 2004;**10**(2 Suppl 1): S53-57.
236. Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H, Ito H, Yamamoto S, Hasebe K, Onishi I, Muraoka K, Ninomiya I, Tani T, Hashimoto T, Yagi M, Miwa K. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 2000;**32**(7): 2310-2313.
237. Nilsson B, Friman S, Gustafsson BI, Delbro DS. Preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver. *J Gastrointest Surg* 2000;**4**(1): 44-49.
238. Zapletal C, Maksan SM, Lehmann T, Guenther L, Fallsehr C, Mehrabi A, Weiss G, Golling M, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 1999;**31**(8): 3260-3262.

239. Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* 2002;**8**(12): 1182-1191.
240. 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;**16**(12): 1654-1656.
241. Adam R, Arnault I, Bao YM, Salvucci M, Sebagh M, Bismuth H. Effect of ischemic preconditioning on hepatic tolerance to cold ischemia in the rat. *Transpl Int* 1998;**11 Suppl 1**: S168-170.
242. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**(1): H198-207.
243. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;**235**(3): 400-407.
244. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P, Lemoine A, Adam R, Castaing D. 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;**202**(2): 203-211.
245. Dekker LR. Toward the heart of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1998;**37**(1): 14-20.
246. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000;**86**(3): 263-275.
247. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation. *Transplant Proc* 1999;**31**(1-2): 425-427.
248. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;**32**(2): 297-302.

249. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;**73**(8): 1203-1211.
250. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002;**36**(1): 78-84.
251. Ishikawa Y, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Sakai Y, Yamamoto M, Yamaoka Y. Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res* 1999;**87**(2): 178-184.
252. Ricciardi R, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Donohue SE, Wheeler SM, Quarfordt SH, Callery MP, Meyers WC, Chari RS. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 2001;**72**(3): 406-412.
253. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology* 2000;**31**(1): 166-172.
254. Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002;**36**(3): 573-581.
255. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998;**66**(5): 579-585.
256. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Rodes J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;**71**(4): 529-536.
257. Geller DA, Chia SH, Takahashi Y, Yagnik GP, Tsoulfas G, Murase N. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation

injury after rat liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;**25**(3): 142-147.

258. Langle F, Steininger R, Waldmann E, Grunberger T, Benditte H, Mittlbock M, Soliman T, Schindl M, Windberger U, Muhlbacher F, Roth E. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997;**63**(9): 1225-1233.

259. Liu P, Xu B, Hock CE, Nagele R, Sun FF, Wong PY. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. *Am J Physiol* 1998;**275**(6 Pt 2): H2191-2198.

260. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995;**4**(4): 282-288.

261. Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;**29**(3): 809-813.

262. Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997;**27**(1): 163-169.

263. Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Calabrese F, Pettenazzo E, Sarzo G, Parnigotto A, Bacelle L, Rigotti P. Protective effect of L-arginine on liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1997;**29**(1-2): 393-394.

264. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997;**183**(4): 477-485.

265. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998;**27**(3): 755-764.

266. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;**266**(7): 4244-4250.
267. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992;**5**(6): 834-842.
268. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;**268**(5 Pt 1): L699-722.
269. Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995;**108**(2): 603-605.
270. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999;**68**(1): 89-96.
271. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;**67**(8): 1099-1105.
272. Ishigami F, Naka S, Takeshita K, Kurumi Y, Hanasawa K, Tani T. Bile salt tauroursodeoxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;**72**(11): 1803-1807.
273. Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999;**276**(5 Pt 1): G1069-1073.
274. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**282**(5): 1075-1079.
275. Roth E. The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;**1**(1): 97-99.

276. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;**30**(6): 1481-1489.
277. Dhar DK, Yamanoi A, Ohmori H, Nakashima Y, Yamamoto A, Osama NE, Kubota H, Kohno H, Nagasue N. Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology* 1998;**28**(3): 782-788.
278. Kume M, Yamamoto Y, Yamagami K, Ishikawa Y, Uchinami H, Yamaoka Y. Pharmacological hepatic preconditioning: involvement of 70-kDa heat shock proteins (HSP72 and HSP73) in ischaemic tolerance after intravenous administration of doxorubicin. *Br J Surg* 2000;**87**(9): 1168-1175.
279. Yamada F, Abe T, Saito T, Tsuciya T, Ishii S, Gotoh M. Ischemic preconditioning enhances regenerative capacity of hepatocytes after prolonged ischemia. *Transplant Proc* 2001;**33**(1-2): 956.
280. Saito T, Ishii S, Abe T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, Suzuki M, Gotoh M. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. *Transplant Proc* 2001;**33**(1-2): 849.
281. Zhang Y, Zhang B, Pan R. Protective effect of ischemic preconditioning on liver. *Chin J Traumatol* 2001;**4**(2): 123-125.
282. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menendez S, Martinez-Sanchez G, Re L, Giuliani A, Leon OS. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res* 2002;**45**(4): 333-339.
283. Iwasaki Y, Tagaya N, Hattori Y, Yamaguchi K, Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against intermittent warm-ischemia-induced liver injury. *J Surg Res* 2002;**107**(1): 82-92.
284. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg* 2006;**19**(2): 113-123.

285. Caraceni P, Gasbarrini A, Nussler A, Di Silvio M, Bartoli F, Borle AB, Van Thiel DH. Human hepatocytes are more resistant than rat hepatocytes to anoxia-reoxygenation injury. *Hepatology* 1994;**20**(5): 1247-1254.
286. Huguet C, Gavelli A, Bona S. Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. *J Am Coll Surg* 1994;**178**(5): 454-458.
287. Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L, Bloch P, Aranda A, Bosch M, Huguet C. An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1980;**150**(6): 859-864.
288. Park KM, Kramers C, Vayssier-Taussat M, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury, MAPK and MAPK kinase activation, and inflammation by remote transient ureteral obstruction. *J Biol Chem* 2002;**277**(3): 2040-2049.
289. Behrends M, Walz MK, Kribben A, Neumann T, Helmchen U, Philipp T, Schulz R, Heusch G. No protection of the porcine kidney by ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 2000;**85**(6): 819-827.
290. Arend LJ, Thompson CI, Spielman WS. Dipyridamole decreases glomerular filtration in the sodium-depleted dog. Evidence for mediation by intrarenal adenosine. *Circ Res* 1985;**56**(2): 242-251.
291. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, Shapiro JL. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail* 1999;**21**(2): 135-145.
292. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 1997;**79**(6): 842-847.
293. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G. Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci* 2001;**69**(1): 1-15.
294. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *Faseb J* 2005;**19**(9): 1155-1157.

295. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;**260**(3 Pt 1): G355-362.
296. Kim Y-M, Kim T-H, Chung H-T, Talanian RV, Yin X-M, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through snitrosylation of caspase-8. . Kim Y-M, Kim T-H, Chung H-T, Talanian RV, Yin X-M, Billiar TR: Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through snitrosylation of caspase-8 *Hepatology* 2000; 32:770–778 *Hepatology* 2000:770-778.
297. Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, Miwa K. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002;**74**(4): 551-556.
298. Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Wheeler SM, Donohue SE, Sheth KR, Callery MP, Chari RS. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res* 2001;**97**(2): 144-149.
299. 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;**161**(2): 587-601.
300. Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, Esumi H, Inoue K, Takayama T, Makuuchi M. Increased nitric oxide production in the liver in the perioperative period of partial hepatectomy with Pringle's maneuver. *J Hepatol* 1998;**28**(2): 212-220.

7. ARTIGO CIENTÍFICO 1

7.1. Versão em português

**PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO PROTEGE DA LESÃO DE ISQUEMIA
E REPERFUSÃO HEPÁTICA NORMOTÉRMICA, PELA MANUTENÇÃO DA
ULTRA-ESTRUTURA MITOCONDRIAL E INIBIÇÃO DA APOPTOSE
ATRAVÉS DA VIA DA CASPASE 3**

Rafael Omar Giovanardi, MD¹

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD²

Carlos Thadeu Cerski, MD, PhD³

Miriam Salvador, PhD⁴

Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

¹ Professor do Departamento de clínica cirúrgica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

² Professor do curso de pós graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

³ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Professora do Departamento de Bioquímica da da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

⁴ Professor do Departamento de Patologia, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Correspondência e solicitação de cópias: Rafael Omar Giovanardi, Departamento de clínica cirúrgica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil. Rua vinte de Setembro, 1695, Caxias do Sul, RS, Brasil. CEP 95020-450. Fone/Fax: 55 54 3223 1257.

Palavras chave: lesão hepática, isquemia e reperfusão, condicionamento, apoptose.

Título resumido: Precondicionamento isquêmico protege o fígado da isquemia/reperfusão.

RESUMO

OBJETIVO: O benefício do condicionamento isquêmico (PCI) lesões de isquemia e reperfusão hepática têm sido descrito, porém, o link entre o condicionamento isquêmico, a apoptose/necrose e as mudanças na ultra-estrutura mitocondrial na lesão de isquemia e reperfusão hepática normotérmica não está claramente estabelecido. Este estudo avaliou os efeitos do condicionamento isquêmico na fase precoce da reperfusão hepática, após isquemia em fígado de suínos, particularmente, observando alterações na morfologia das células hepáticas e apoptose/necrose e mudanças na ultra-estrutura mitocondrial.

MÉTODOS: Estabeleceu-se um modelo experimental de 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão, em suínos, mediante bypass venovenoso passivo. Dezoito suínos híbridos (fêmeas) foram randomizados em grupo-controle (sham grupo), grupo não condicionado (isquemia e reperfusão) e grupo submetido a um condicionamento isquêmico (10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusão) antes da isquemia e reperfusão. Concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade sérica dos antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram medidos. A produção de bile durante a reperfusão foi medida. Amostras do tecido hepático foram retiradas aos 180 minutos da reperfusão para análise histológica e de microscopia eletrônica. As células apoptóticas foram determinadas pela técnica imunistoquímica com anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada. A ultra-estrutura mitocondrial foi observada por meio da microscopia eletrônica.

RESULTADOS: O condicionamento isquêmico aumentou a produção de bile ($P < 0,01$) e atenuou a elevação sérica da AST ($P < 0,01$) quando comparado com o grupo não condicionado. A concentração sérica do TBARS foi significativamente reduzida nos 180 minutos da reperfusão ($P = 0,05$), e a atividade da CAT foi significativamente maior nos 60 ($P = 0,02$) e 180 ($P < 0,01$) minutos da reperfusão, no grupo condicionado. A congestão sinusoidal ($P = 0,02$) e a infiltração de polimorfonucleares ($P = 0,01$), nos sinusóides, foi mais

evidente no grupo não condicionado quando comparado com o grupo-controle. A atividade da caspase 3 demonstrou a apoptose como forma predominante de morte celular na fase precoce da reperfusão. O grupo submetido ao condicionamento isquêmico apresentou 3 vezes menos atividade da caspase 3 quando comparada com o grupo não condicionado ($P<0,01$). A lesão mitocondrial foi atenuada no grupo condicionado ($P<0,01$).

CONCLUSÃO: Neste estudo, demonstramos que a apoptose foi a forma predominante de morte das células hepáticas na fase precoce da reperfusão. O condicionamento isquêmico inibiu a apoptose das células hepáticas, e foi associado a uma melhor preservação da ultra-estrutura mitocondrial e inibição da atividade da caspase 3.

INTRODUÇÃO

A lesão hepática de isquemia e reperfusão é uma importante causa de disfunção do fígado e ocorre após várias formas de choque, cirurgia hepática, para trauma ou câncer e no transplante de fígado. Uma das estratégias utilizadas para diminuir a lesão hepática, e que poderia ser utilizada tanto em cirurgia de fígado quanto em transplante hepático, é o condicionamento isquêmico (PCI). O condicionamento isquêmico consiste em um curto período de isquemia, seguido por um breve período de reperfusão, antes de um segundo e prolongado período de isquemia.¹ O condicionamento isquêmico tem demonstrado diminuir a lesão tecidual após a reperfusão de diversos órgãos, tais como: coração, cérebro, músculo esquelético, medula espinhal, rim, intestino,^{1, 2} em modelos experimentais de isquemia e reperfusão hepática e em cirurgias em humanos.^{1, 3}

Apesar de a grande maioria dos trabalhos evidenciarem o papel protetor do condicionamento isquêmico, tanto nas lesões de isquemia e reperfusão normotérmica quanto hipotérmica, alguns poucos estudos demonstraram apenas um benefício limitado desse método.⁴⁻⁶ Além disso, recentemente, Azulay e cols.⁷ não encontraram benefício algum na utilização do condicionamento isquêmico para a realização de hepatectomia em humanos, com a utilização de exclusão vascular total do fígado.

Os efeitos hepáticos do condicionamento isquêmico têm sido demonstrados em várias espécies, incluindo roedores, suínos, bem como em humanos. Embora a maioria dos dados disponíveis na literatura derive de estudo em roedores,¹ é reconhecido que a extrapolação desses resultados a animais de grande porte e a humanos apresenta limitações.¹ Por outro lado, existem muitas similaridades entre o fígado de suínos e de humanos, especialmente no que tange à fisiologia e anatomia, o que faz destes o modelo experimental mais adequado para a realização de estudos sobre a isquemia e reperfusão

hepática.^{8, 9} Não obstante, como em humanos, dados sobre o condicionamento isquêmico em fígado de suínos são escassos na literatura.¹

Apesar de os efeitos benéficos do condicionamento isquêmico terem sido sugeridos a vários órgãos, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno permanecem controversos.^{1, 10} Dentre as diversas teorias, o condicionamento isquêmico parece atuar por um mecanismo de adaptação endógena para prevenção de lesão decorrente de isquemia e reperfusão.¹¹ Dados extraídos de estudos sobre o condicionamento no músculo cardíaco sugerem, fortemente, que o condicionamento isquêmico atua mediante mecanismos que envolvem vias de receptores-alvo na célula (*receptor-targeting*),^{12, 13} ou seja, moléculas liberadas durante a isquemia acoplam-se a receptores celulares, resultando na resposta do condicionamento. Vários mediadores de proteção têm sido propostos e investigados no condicionamento isquêmico hepático, incluindo: adenosina,^{14, 15} óxido nítrico (NO),^{14, 16} estresse oxidativo,^{17, 18} modulação da cascata da apoptose, pela inibição das cisteíno-proteases, conhecidas como caspases, e inibição da liberação do citocromo c pela mitocôndria,¹⁹⁻²¹ além de inúmeros outros.

Nesse contexto, a mitocôndria parece ser o alvo central da lesão de isquemia e reperfusão, e sua disfunção, um importante fator patogênico.²² A mitocôndria é uma organela celular com importante papel na geração de energia; adequação da pressão osmótica; no “balanço” do cálcio e na manutenção do pH. A mitocôndria realiza sua função pela produção de ATP e de espécies reativas de oxigênio, as quais são também identificadas como sinais regulando a expressão de gens e ativação da morte celular.^{23, 24}

A reperfusão dos tecidos isquêmicos tem implicado modificações oxidativas e prejuízo funcional da mitocôndria,²⁵ o que, em última análise, resulta na perda da integridade mitocondrial, particularmente alteração na transição da permeabilidade, resultando em edema mitocondrial.²⁵ Além disso, tem sido proposto que a transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) é responsável pela liberação de fatores apoptogênicos em um grande número de condições

patológicas que envolvem a apoptose, incluindo lesão de isquemia e reperfusão.²¹ Esses fatores apoptogênicos claramente incluem o citocromo c,^{21, 26} e podem também incluir protease(s),²⁶ principalmente as da família das caspases.²⁷ Portanto, tem sido sugerido que os efeitos benéficos do condicionamento isquêmico reduzem a peroxidação lipídica da membrana mitocondrial,^{25, 28} bem como as alterações na sua integridade, particularmente a transição da permeabilidade mitocondrial,^{21, 25} além de melhorar o metabolismo energético.²⁵

Embora os efeitos benéficos do condicionamento isquêmico nas lesões hepáticas de isquemia e reperfusão tenham sido descritos, o *link* entre o condicionamento isquêmico, a apoptose/necrose e as mudanças na ultra-estrutura mitocondrial na lesão de isquemia e reperfusão hepática normotérmica não está claramente estabelecido, e raramente é reportado a animais de grande porte. Portanto, este estudo avaliou os efeitos do condicionamento isquêmico na fase precoce da reperfusão hepática, após isquemia em fígado de suínos, particularmente, observando alterações na morfologia das células hepáticas e apoptose/necrose e mudanças na ultra-estrutura mitocondrial.

MATERIAIS E METODOS

Animais e técnica cirúrgica

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Universidade de Caxias do Sul e foi realizado de acordo com as normas aprovadas para estudo com animais. Dezoito suínos (fêmeas) híbridos, pesando entre 18 e 23 kg foram usados. Após refeição noturna, os animais foram sedados com Cloridrato de Ketamina (Cristália, Brasil) (2mg/kg intramuscular) e sulfato de atropina (Cristália, Brasil) (0,025 mg/kg intramuscular) e anestesiados com thiopental sódico (Cristália, Brasil) (0,5 mg/kg intravenoso). Os animais foram intubados e conectados a um respirador automático (Takaoka model KT-13, série Sansei plus, Brasil), e mantidos sob anestesia geral com uma mistura de oxigênio e isoflurano (Isoforine - Cristália, Brasil). Por meio de uma incisão cervical, a artéria carótida e ambas veias jugulares foram isoladas. A artéria foi cateterizada com um cateter de polietileno para medida da pressão arterial média. As veias jugulares foram cateterizadas para reposição volêmica, usando solução salina isotônica, e para a medida da pressão venosa central. A temperatura corporal foi monitorada pela introdução de um termômetro por um orifício puntiforme na região axilar e mantida acima de 37°C por meio de campos cirúrgicos aquecidos. O traçado eletrocardiográfico e a oximetria foram continuamente monitorados durante todo o procedimento. Por meio de uma incisão mediana, o fígado foi esqueletizado, e foram seccionados os ligamentos suspensores. A veia porta, a artéria hepática e o ducto biliar comum foram isolados. A isquemia hepática foi induzida pela oclusão da veia porta, da artéria hepática sem a oclusão do ducto biliar. Para evitar congestão esplâncnica, realizou-se uma circulação venovenosa extracorpórea passiva. Para isto, utilizou-se um *bypass* venovenoso entre a veia esplênica e a veia jugular interna esquerda, com um tubo siliconado. Realizou-se heparinização sistêmica com 2,000 unidades de heparina 5 minutos antes da isquemia. O ducto biliar comum foi cateterizado proximalmente para determinar a produção de bile durante o período de isquemia e reperfusão; o ducto cístico foi ocluído. A isquemia hepática foi mantida por 90 minutos, e a reperfusão foi

realizada posteriormente por 180 minutos. A congestão esplâncnica não foi macroscopicamente observada durante o período de isquemia. Não foi necessário o uso de vasopressores. Os animais foram sacrificados 3 horas após a reperfusão.

Coletas sangüíneas (5 ml) foram realizadas e armazenadas em tubos heparinizados no começo da laparotomia; antes da reperfusão (aos 75 minutos de isquemia); nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos da reperfusão. Determinaram-se as concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Realizou-se biópsia hepática aos 180 minutos da reperfusão, para determinar alterações histológicas e à microscopia eletrônica.

Modelo do experimento

Os animais foram randomizados em três grupos, com seis animais em cada. Grupo-controle (*sham operated*): o fígado foi exposto por 5 horas, não houve isquemia hepática (os animais foram submetidos à anestesia, laparotomia e dissecação das estruturas do hilo hepático); grupo não condicionado (isquemia e reperfusão ou IR): animais foram submetidos a 90 minutos de isquemia hepática e, posteriormente, a 180 minutos de reperfusão; grupo condicionamento isquêmico (PCI+IR): submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

Análise das enzimas hepáticas

Realizou-se coleta de sangue antes da isquemia e no final do período de reperfusão. O sangue foi centrifugado e o plasma separado. A lesão hepática irreversível foi avaliada pela determinação das concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As determinações séricas da AST e ALT foram realizadas pelo método enzimático

colorimétrico, por meio de sistema automatizado SELECTRA II Merck,[®] utilizando *kit* comercial da Labtest (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). Os resultados foram expressados em UI/L.

Determinação da produção de bile

A produção de bile, como parâmetro de função excretora do fígado, foi monitorada durante todo o período da reperfusão e expressa como mililitros/3 horas de reperfusão.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica tem sido usada como uma medida indireta da lesão oxidativa induzida pelos radicais livres de oxigênio. A determinação dos níveis de estresse oxidativo foi realizada medindo-se os produtos de reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo método descrito por Wills 1966.²⁹ e o resultado descrito em nmol/mL. Amostras de sangue foram coletadas antes da isquemia; antes da reperfusão (aos 75 minutos de isquemia); nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos da reperfusão. Essa análise permite estudar a peroxidação lipídica mediante a quantificação dos aldeídos formados pela degradação dos hidroperóxidos.

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi medida espectrofotometricamente em amostras de sangue coletado. O método baseia-se na inibição pela SOD da formação de adenocromo, decorrente da auto-oxidação da epinefrina. Baseando-se nesse fenômeno, a SOD pode ser medida espectrofotometricamente seguindo a diminuição de absorvância da epinefrina a 480 nm em uma reação contendo 1mmol/L epinefrina (pH 2,0) and 50 mmol/L glycina (pH 10,2),³⁰ ambas da E- Merck[®]. Essa reação foi conduzida em uma temperatura constante de 30°C durante 3 minutos. Os resultados foram descritos como unidades de superóxido dismutase por grama de proteína (U/g de proteína). Uma unidade é

definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação do adenocromo em 50%.

Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

O método de medida para a atividade da catalase (CAT) foi realizado de acordo com o descrito por Aebi.³¹ O princípio do método é baseado na determinação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (E- Merck[®]), medido espectrofotometricamente a 240 nm. Essa reação foi conduzida em uma temperatura constante de 30°C durante um minuto. Os resultados foram descritos como unidades de catalase por mg de proteína (U/mg de proteína). Uma unidade de catalase decompõe 1 μ mole of H_2O_2 por min a um pH 7.4 e 30°C.

Proteínas

O nível total de proteínas foi analisado pelo método Biureto (Kit Proteínas Totais/Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), pela determinação espectrofotométrica a 545nm.

Avaliação histológica e imunoistoquímica

As amostras de tecido hepático foram retiradas de cada um dos seis animais de cada grupo aos 180 minutos da reperfusão, para análise histológica, pela coloração com haematoxilina and eosina (H&E) e, imunoistoquímica, pelo anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) ao microscópio óptico (Olympus BX 41, Japan). Um patologista, experiente em patologia hepática, examinou as lâminas sem ter conhecimento dos grupos.

Haematoxylina and Eosina (H&E): As biópsias foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em blocos de parafina. As secções, após coradas com haematoxilina and eosina (H&E), foram examinadas ao microscópio óptico para a verificação morfológica da ocorrência de congestão sinusoidal, vacuolização

do citoplasma, infiltração de polimorfonucleares (PMNs), esteatose e necrose. Os critérios morfológicos para necrose foram previamente descritos: aumento da eosinofilia, rompimento celular, perda da arquitetura e *karyolysis*.²⁸

A quantificação da congestão sinusoidal, vacuolização do citoplasma, infiltração de polimorfonucleares (PMNs), esteatose e necrose foi determinada semiquantitativamente: congestão sinusoidal (escore 0 – 3): ausente = 0; leve (dilatação da veia centro-lobular) = 1; moderada (dilatação da veia centro-lobular + dilatação sinusoidal da zona 3) = 2; severa (dilatação da veia centro-lobular + dilatação sinusoidal da zona 3 e zona 2) = 3; vacuolização do citoplasma (escore 0 – 3): ausente = 0; leve (raros hepatócitos perivenulares) = 1; moderada (numerosos hepatócitos perivenulares) = 2; severa (alterações dos hepatócitos além da zona 3) = 3; PMNs (escore 0 - 4) ausente = 0; raras células = 1; focal = 2; multifocal = 3; difusa e uniformemente intensa = 4; necrose (escore 0 – 4): ausência necrose = 0; focos de necrose (alguns hepatócitos necróticos na zona 3) = 1; necrose focal (periportal ou perivenular ou no meio do ácino) = 2; necrose multifocal (necrose em mais do que uma zona acinar) = 3; necrose lobular (necrose-ponte entre as estruturas vasculares portais e centro-lobular – difusa, zonas 1, 2, 3) = 4; e esteatose (escore 0 – 3) <5% = 0; leve (33%) = 1; moderada (33% - 66%) = 2; severa (>66%) = 3.

Caspase 3: Imunoistoquímica para caspase 3 clivada foi realizada em tecido fixado em formalina e incluído em parafina de amostras de fígados de suínos retiradas de cada grupo aos 180 minutos de reperfusão. Para a preparação imunoistoquímica, cortes de quatro micrômetros dispostos em lâminas silanizadas foram desparafinizados em xileno, hidratados em álcool e pré-tratados para recuperação antigênica em ácido cítrico (pH 6,0) utilizando-se steamer à temperatura de 98°C por 20 minutos. As lâminas foram incubadas, empregando-se anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) na diluição de 1:300, anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho na diluição de 1:320 (BA-1000, *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA), sistema de detecção VECTASTAIN Elite ABC kit (PK-6100, *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA) e cromógeno diaminobenzidina-DAB

(D5637, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). Controles positivo (tecido linfóide) e negativo atestam a fidelidade da reação.

A análise morfométrica das células coradas pela técnica imunoistoquímica foi realizada com microscopia óptica, utilizando-se uma ampliação (magnificação de 400x) (Olympus BX 41, Japan). Para avaliação da atividade da caspase 3, efetuou-se uma análise semiquantitativa das células que evidenciaram marcação pelo anticorpo aplicado. O número de células positivas para a reação imunoistoquímica foi determinado pela contagem do número de núcleos positivos presentes em 20 campos randomizados em cada lâmina. A avaliação abrangeu a contagem de 10 espaços porta (um espaço porta por campo, tendo como referência central o espaço porta, priorizando região de septos para aumentar o número de células contadas) e 10 veias centro-lobulares (uma veia centro-lobular por campo, tendo como referência central a veia centro-lobular terminal), o que representou uma área total de 360 mm² (18 mm²/campo). O número de hepatócitos e de células sinusoidais (SLCs) apoptóticas foram contadas independentemente e definidas pela média, como o número total de células da respectiva população avaliada. As células apoptóticas consideradas apresentaram características previamente descritas.³² As células que demonstraram coloração marrom do citoplasma e as células positivas livres no interior dos sinusóides (linfócitos e PMNs) não foram consideradas positivas para o marcador de caspase 3. A presença de áreas de marcada infiltração linfocítica ou necrose foram afastadas para contar células apoptóticas, como previamente descrito.³³

Microscopia eletrônica

As amostras de tecido hepático foram retiradas de cada um dos seis animais, de cada grupo, aos 180 minutos da reperfusão, para avaliação mediante microscopia eletrônica. A avaliação pela microscopia eletrônica foi feita por dois observadores cegos para os grupos estudados.

O material, após biópsia (um mm³), foi imediatamente colocado em solução fixadora com Glutaraldeído 2%. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% tamponado, seguido então por uma etapa de contrastação in bloc com acetato de uranila 1%. A desidratação processou-se em série alcoólica gradativa. A pré-embrição do material foi feita em uma mistura de epon 812 com acetona pura nas seguintes proporções: 75%, 50%, 25%. A embebição foi feita com epon 812 puro durante 24 horas. A polimerização efetuou-se em estufa a 60°C constantes por 72 horas. Os cortes semifinos foram feitos no ultramicrotomo, Leica Ultracut UCT 2.0, sendo utilizada navalha de diamante, *Drukker type histo with trough 8 mm*, com uma espessura de 800 nm e corados com solução aquosa de azul de toluidina 1% + fucsina básica. Os cortes ultrafinos foram feitos com uma espessura de 70 nm no mesmo ultramicrotomo, com uma navalha de diamante, (*Drukker type histo with trough 3 mm*). Para a contrastação dos cortes ultrafinos, utilizou-se solução de uranila metanílica e após citrato de chumbo.³⁴ O microscópio eletrônico utilizado para a observação dos cortes ultrafinos foi o EM208S Philips (Philips Electronic Instruments Inc, Eindhoven, Holland), com a voltagem de aceleração de 80-kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/RS).

Alterações das mitocôndrias: As modificações ultra-estruturais das mitocôndrias foram avaliadas para determinar a presença de edema mitocondrial e alterações na membrana mitocondrial. O edema mitocondrial foi avaliado semiquantitativamente pela média da medida das áreas de 10 mitocôndrias próximas ao núcleo de cada animal usando *software* Carnoy v. 2.0 (<http://www.carnoy.org>) para a medida da área da elipse: $A = \pi ab$; onde (a) representa o semidiâmetro maior e (b) o semidiâmetro menor. A medida das mitocôndrias foi efetuada por dois observadores cegos para o tratamento realizado em cada grupo e a medida foi expressa em μm .

Análise estatística

Considerando que havia interesse em testar diferenças com magnitudes de efeito iguais ou maiores do que duas unidades de desvio padrão ($E/S \geq 2$),

estimou-se que, com seis (6) animais por grupo, obter-se-ia um poder estatístico de aproximadamente 90% em um nível de significância $\alpha=0,05$. Os dados foram descritos por média e desvio padrão e, em escores de escala de pouca amplitude, optou-se pela mediana, e os valores mínimo e máximo. A evolução dos valores de TBARS, SOD e CAT foi avaliada por modelo de análise de variância de medidas repetidas. As outras comparações envolvendo momentos específicos foram avaliadas por oneway-ANOVA com localização de diferenças por teste de Tukey. Os escores foram ordenados em postos (*Rank*) e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$, sendo os dados analisados com o programa SPSS versão 12.0 e *SigmaPlot* versão 8.0.³⁵

RESULTADOS

Análise das enzimas hepáticas

As modificações séricas das aminotransferases, 180 minutos após a reperfusão, estão resumidas na tabela 1. Os níveis séricos da AST e ALT no grupo-controle não sofreram alteração significativa durante o procedimento. No grupo não condicionado, as concentrações séricas da AST e ALT aumentaram aproximadamente 15 e 2 vezes, respectivamente, em relação ao grupo-controle. Essas alterações foram significativamente diminuídas pelo condicionamento isquêmico (Figura 1).

Função excretora do fígado (produção de bile)

Após 180 minutos de reperfusão, a produção de bile foi quase completamente parada no grupo não condicionado, ($5,3 \pm 3,3$ ml); por outro lado, a produção de bile no grupo submetido ao condicionamento isquêmico ($21,2 \pm 6,9$ ml) atingiu aproximadamente 50% do volume produzido pelo grupo-controle ($49,3 \pm 8,4$ ml) ($P < 0,01$) (Tabela 1).

Níveis séricos do TBARS e atividade sérica das enzimas antioxidantes CAT e SOD

Apesar de termos observado níveis estatisticamente mais elevados de TBARS nos 180 minutos da reperfusão no grupo não condicionado ($4,40 \pm 1,25$) em relação do grupo submetido ao condicionamento isquêmico ($3,01 \pm 0,39$) ($P = 0,05$), esta relação não foi observada em relação ao grupo-controle ($3,47 \pm 0,81$) (Figura 2).

A atividade da SOD não foi diferente entre os três grupos em nenhuma das amostras. A atividade da CAT foi significativamente maior no grupo submetido ao condicionamento isquêmico ($4,01 \pm 2,73$), quando comparada com o grupo

não condicionado ($1,02 \pm 0,83$) e com o grupo-controle ($1,20 \pm 0,72$) 60 minutos após a reperfusão ($P=0,02$). Esta relação também foi encontrada nos 180 minutos da reperfusão ($4,40 \pm 1,80$ PCI+IR; vs. $1,0 \pm 0,44$ IR; vs. $1,10 \pm 1,40$ grupo-controle; $P < 0,01$).

Alterações histológicas

A avaliação das amostras hepáticas pela microscopia óptica, obtida no final dos 180 minutos de reperfusão, demonstrou apenas alterações de menor magnitude nos três grupos. A esteatose foi menor que 5% em todos os grupos ($P=0,39$), a vacuolização do citoplasma esteve presente em raros hepatócitos perivenulares ($P=0,24$), e a necrose hepática foi de pequena monta igualmente nos três grupos ($P=0,24$). A congestão sinusoidal e a infiltração dos polimorfonucleares (PMNs) nos sinusóides foi mais evidente no grupo não condicionado (IR) em relação ao grupo-controle ($P=0,02$ e $P=0,01$; respectivamente) (figure 3).

Atividade da caspase 3

Mediante microscopia óptica e observação da atividade da caspase 3, observou-se que a morte celular, na fase precoce da reperfusão, ocorreu primariamente pela apoptose. As células apoptóticas ocorreram na mesma proporção entre as zonas centro-lobular e portal em cada grupo ($p > 0,05$). O grupo não condicionado demonstrou aproximadamente 3 vezes mais atividade da caspase 3, quando comparado com o grupo submetido ao condicionamento isquêmico ($P < 0,01$). O escore total de células apoptóticas (zona centrolobular + zona portal), no grupo não condicionado, foi significativamente maior que o encontrado no grupo submetido ao condicionamento isquêmico e que o encontrado no grupo-controle ($39,0 \pm 12,7$ vs $12,0 \pm 10,1$ vs $3,2 \pm 2,9$; $P < 0,01$), respectivamente. O escore de células apoptóticas por zona (centro-lobular e portal), foi significativamente maior no grupo não condicionado ($21,8 \pm 7,7$ and $17,2 \pm 8,0$) que no grupo submetido ao condicionamento isquêmico ($6,3 \pm 5,7$ and $5,7 \pm 4,9$) e que o grupo-controle ($1,8 \pm 1,5$ e $1,5 \pm 1,6$) ($P < 0,01$) (Figure 4).

No grupo submetido ao condicionamento isquêmico, não se encontrou diferença na atividade da caspase 3 entre os hepatócitos e células sinusoidais na zona centro-lobular ($2,0 \pm 2,2$ vs. $4,0 \pm 3,6$; respectivamente, $P=0,14$); porém, encontrou-se diferença na atividade da caspase 3 entre os hepatócitos e as células sinusoidais na zona portal ($1 \pm 1,5$ vs. $4,7 \pm 3,7$; respectivamente, $P=0,02$). No grupo não condicionado, o escore de células sinusoidais apoptóticas foi maior que o escore dos hepatócitos apoptóticos, tanto na zona centro-lobular ($14,8 \pm 6,7$ vs. $5,7 \pm 1,8$; respectivamente, $P=0,02$) quanto na zona portal ($12,5 \pm 5,5$ vs. $4,7 \pm 3,8$; respectivamente, $P=0,01$) (Figura 5A, B, C).

Modificações ultra-estruturais das mitocôndrias

No grupo-controle a ultra-estrutura mitocondrial foi normal, disposta organizadamente na forma cilíndrica ou elíptica sem edema. A membrana mitocondrial apresentou-se intacta e bem visualizada. Em ambos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão, edema mitocondrial, bem como alteração na membrana das mitocôndrias foi observado; porém, essas alterações foram significativamente menos intensas no grupo submetido ao condicionamento isquêmico em relação ao grupo não condicionado (Figuras 6A, B, C). A área das mitocôndrias foi maior no grupo não condicionado ($0,6623 \pm 0,2241 \mu\text{m}$) em relação ao grupo-controle ($0,3391 \pm 0,0714 \mu\text{m}$) e em relação ao grupo submetido ao condicionamento isquêmico ($0,4493 \pm 0,1456 \mu\text{m}$) ($P < 0,01$) (Figura 7).

DISCUSSÃO

Nesse modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática normotérmica em suínos, o condicionamento isquêmico resultou em aumento da resistência das células hepáticas à isquemia e reperfusão. Observou-se uma melhora da função hepatocelular e uma melhor preservação da integridade das células hepáticas, como resultado do efeito protetor do condicionamento isquêmico. Os mecanismos protetores desse condicionamento resultaram em menor concentração sérica da aspartato aminotransferase; em aumento da produção de bile e resultaram em uma redução significativa da apoptose das células sinusoidais e dos hepatócitos. A alteração da estrutura mitocondrial e a atividade da caspase 3, claramente evidente após a reperfusão, também foram reduzidas pelo condicionamento isquêmico.

Os efeitos hepatoprotetores do condicionamento isquêmico contra as lesões de isquemia e reperfusão hepática foram claramente demonstrados nesse modelo experimental em suínos. A redução significativa dos níveis séricos da AST, 3 horas após reperfusão, reflete o efeito benéfico desse condicionamento isquêmico nesse modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática *in vivo*. Os níveis séricos da AST foram significativamente elevados em ambos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão; em contraste, os níveis de ALT, apesar de significativamente elevados em relação ao grupo-controle, apresentaram concentrações séricas bem-inferiores. Alguns autores têm descrito que o tempo necessário para a liberação da ALT, na circulação sanguínea, é maior que o da AST, o que justifica esses dados.^{33, 36} A maioria dos estudos clínicos tem usado os níveis séricos das aminotransferases para determinar a lesão hepática resultante da isquemia e reperfusão.^{37, 38}

Essas enzimas são consideradas os marcadores mais sensíveis da lesão isquêmica do fígado, porém as concentrações séricas destas não podem ser utilizadas como marcadores isolados da extensão da lesão irreversível na isquemia e reperfusão hepática.⁵ Portanto, corroborando a redução dos níveis

séricos da AST, demonstra-se também, neste estudo, um significativo aumento na produção de bile no grupo submetido ao condicionamento isquêmico. A produção de bile, como parâmetro da função excretora do fígado, tem sido descrita como um importante marcador das lesões de isquemia e reperfusão hepática.³⁹ Além disso, a bilirrubina também tem sido descrita como um potente pigmento fisiológico com função antioxidante, protegendo as células contra lesão oxidativa.^{40, 41}

Neste estudo, a produção de bile no grupo-controle permaneceu constante durante todo o experimento; por outro lado, foi quase totalmente abolida em ambos os grupos durante a isquemia (dados não mostrados). No final do período de reperfusão, a produção acumulada de bile permaneceu bastante diminuída no grupo não condicionado; entretanto, foi aumentada significativamente no grupo submetido ao condicionamento isquêmico. De forma semelhante, em modelos experimentais prévios realizados em ratos⁴² e em suínos,⁵ a produção acumulada de bile foi maior nos fígados submetidos ao condicionamento isquêmico em relação aos não condicionados.

O condicionamento isquêmico tem também demonstrado efeitos benéficos, durante a fase precoce da reperfusão, pela prevenção da exacerbação do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica dependente da isquemia e reperfusão.^{17, 28} Neste estudo, encontram-se níveis séricos mais elevados de TBARS nos 180 minutos de reperfusão no grupo não condicionado em relação ao grupo submetido ao condicionamento isquêmico. Observou-se, também, uma elevação significativa da CAT nos 60 e 180 minutos após a reperfusão no grupo submetido ao condicionamento isquêmico. Esses dados sugerem um efeito protetor desse método, pelo aumento da atividade desse sistema antioxidante, bem como o envolvimento maior do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como espécie reativa de oxigênio mediadora da lesão celular, como também demonstrado em estudos prévios.^{25, 28}

A elevação significativa da CAT somente a partir dos 60min de reperfusão pode ser justificada pela tendência à modulação tardia desse antioxidante no fígado,

órgão em que tem-se descrito, a primeira enzima a atuar na dismutação do peróxido de hidrogênio (bem como quando em baixas concentrações) é a glutathiona peroxidase (GPx).⁴³ Esse dado apenas pode ser inferido, uma vez que a dosagem dos níveis séricos da GPx não foi objeto deste estudo.

Apesar de a lesão das membranas celulares, pela peroxidação lipídica, ser uma das hipóteses mais difundidas para explicar a lesão provocada pelas espécies ativas de oxigênio, outros mecanismos da lesão celular induzida pelas espécies ativas do oxigênio têm demonstrado ser mais importantes e, dessa forma, os produtos da peroxidação lipídica poderiam ser apenas responsáveis pela ampliação e continuação da resposta inflamatória.⁴⁴ Jaeschke e cols.⁴⁴⁻⁴⁷ usando diferentes modelos de indução de lesão hepática pela peroxidação lipídica *in vivo*, observaram que, quando a peroxidação lipídica foi causa de morte celular, uma grande variedade de parâmetros da lipoperoxidação, incluindo o malondealdeído hepático, aumentaram de 20 a 50 vezes os níveis basais.

Em outras palavras, em virtualmente todos os manuscritos de investigação de lesão hepática de isquemia e reperfusão, incluindo os resultados deste estudo (através da medida sérica do TBARS), os parâmetros da peroxidação lipídica aumentaram menos que três vezes os níveis basais.⁴⁴ Portanto, através de uma análise quantitativa, poder-se-ia também concordar com Jaeschke e cols.⁴⁴ quando referem que é difícil explicar que uma lesão severa durante a reperfusão poderia ter sido causada por uma peroxidação lipídica moderada.

A isquemia e reperfusão hepática, além de alterações metabólicas deletérias, pode induzir também a modificações morfológicas nas células hepáticas. Em estudos prévios de isquemia e reperfusão hepática,^{38, 48, 49} tem-se observado alterações morfológicas compatíveis com lesão celular, demonstradas tanto pela microscopia óptica quanto pela microscopia eletrônica.³⁸

Neste estudo, mudanças histológicas e ultra-estruturais foram mais evidentes no grupo não condicionado em relação ao grupo submetido ao condicionamento isquêmico. A isquemia e reperfusão, no grupo não

precondicionado, causou importantes alterações na estrutura mitocondrial, caracterizadas por: edema com perda da visualização das cristas, alteração na densidade da matriz mitocondrial; algumas demonstraram formação de *blebs* e ruptura da membrana mitocondrial externa.

Estudos prévios demonstraram que as células apoptóticas apresentavam condensação da cromatina e mitocôndrias intactas. Atualmente, em muitos modelos apoptóticos, muitas evidências sugerem que ocorrem mudanças significativas nas mitocôndrias, tais como: edema, megamitocôndria, picnose da mitocôndria e rompimento da membrana mitocondrial externa.^{50, 51} De fato, atualmente, a mitocôndria tem sido implicada como organela fundamental na cascata da apoptose, por meio do controle da liberação dos fatores que estimulam as fases tardias da morte por apoptose.²¹ Esses fatores apoptogênicos incluem o citocromo c^{21, 26} e podem incluir também protease(s),²⁶ principalmente aquelas da família das caspases.²⁷

O mecanismo pelo qual existe maior evidência para a liberação de fatores apoptogênicos pela mitocôndria é a formação de edema mitocondrial, que poderia ser induzido tanto pela transição da permeabilidade quanto por outro evento permeabilizador. Uma vez que a permeabilidade da membrana mitocondrial interna está comprometida, forças osmóticas induzem a um aumento do volume da matriz mitocondrial, o que resulta, em última análise, na ruptura da membrana mitocondrial externa.²¹ O método utilizado neste estudo, para quantificar o edema mitocondrial, pela medida da área da elipse, foi simples, rápido e concordante com os demais resultados obtidos para quantificar a lesão das células hepáticas.

Os dados obtidos neste estudo permitem supor que as mudanças na estrutura e função das mitocôndrias foram correlacionados com a ativação e com o desenvolvimento da apoptose celular. Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais o condicionamento isquêmico protegeu a mitocôndria permanece desconhecido.

O conhecimento das moléculas e vias envolvidas na apoptose tem sido motivo de recentes publicações. A quantificação da apoptose no tecido tem sido principalmente baseada no método TUNEL.⁵²⁻⁵⁴ Atualmente, a via de sinalização mais investigada é a cascata das caspases, e a ativação das caspases estabelece-se como uma característica típica da apoptose.^{55, 56} Muitas evidências existem para definir a caspase 3 como uma protease que atua na fase final da apoptose, e em diretamente induzir a apoptose.^{19, 56}

Neste estudo, usando a anticaspase 3 como método imunoistoquímico, demonstra-se que o condicionamento isquêmico reduziu a quantidade de células apoptóticas. Em outras palavras, as células apoptóticas foram significativamente aumentadas no grupo não condicionado em comparação ao grupo submetido ao condicionamento isquêmico (aproximadamente três vezes).

Além disso, no grupo submetido ao condicionamento isquêmico, a atividade da caspase 3, apesar de maior, foi estatisticamente semelhante à atividade encontrada no grupo-controle. Resultados semelhantes foram observados por Yadav e cols.²⁰ Neste, o fígado dos controles submetidos a 90 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão, demonstrou três vezes maior atividade da caspase 3 em relação ao grupo submetido ao condicionamento isquêmico.

A cronologia da morte celular não foi objetivo principal deste estudo; porém, nossos dados corroboram a já estabelecida suscetibilidade das células endoteliais dos sinusóides à apoptose.

Demonstra-se que o escore das células endoteliais dos sinusóides apoptóticas foi significativamente maior que o escore dos hepatócitos apoptóticos. Estudos prévios de isquemia e reperfusão hepática, normotérmica e hipotérmica descrevem as células endoteliais dos sinusóides como as primeiras células a sofrerem apoptose após a reperfusão.^{20, 52, 57}

O pequeno número de animais estudados (seis por grupo) é uma das principais limitações deste estudo, o que permite dizer que os dados resultantes podem ter falhado em encontrar diferença estatisticamente significativa nos efeitos de tamanho moderado e pequeno; por outro lado, as diferenças estatisticamente significativas encontradas neste estudo podem ser seguramente aceitas.

Outra possível limitação deste estudo pode ter sido o método utilizado para determinar a peroxidação lipídica (concentração sérica do TBARS), o qual não demonstrou ser o estresse oxidativo o mais importante componente da lesão tecidual, contrariando os resultados dos testes hepáticos utilizados neste estudo e a avaliação morfológica das células hepáticas, as quais demonstraram claramente a proteção do condicionamento isquêmico. Corroborando essa hipótese, estudos usando o condicionamento farmacológico com L-arginina têm demonstrado que não existe uma correlação entre os níveis teciduais (significativamente mais baixos que os encontrados nos controles) e séricos de malondealdeído.^{33, 58}

Além disso, estudos com o condicionamento isquêmico têm demonstrado resultados concordantes entre as concentrações teciduais de malondealdeído e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no tecido hepático, com os resultados encontrados nos testes de função e avaliação morfológica hepatocelular.^{25, 33, 58} Portanto, a importância da peroxidação lipídica na lesão de isquemia e reperfusão hepática, bem como a correlação entre os níveis séricos e teciduais dos parâmetros de peroxidação lipídica e dos sistemas antioxidantes enzimáticos CAT e SOD representa importante área para futuras investigações.

Este estudo foi designado para observar as alterações das células hepáticas na fase precoce da reperfusão (início da reperfusão até a terceira ou quarta hora), o que pode ter subestimado achados especialmente em relação ao modo da morte celular (apoptose e/ou necrose). Recentemente, a apoptose tem sido implicada como a principal via de morte celular durante a isquemia e reperfusão hepática normotérmica por alguns autores.^{52-54, 59} Outros trabalhos concluíram que a principal maneira de morte celular, durante a isquemia e reperfusão hepática,

seria mais pela necrose que pela apoptose.^{60, 61} Nesse contexto, parece que ambas as formas de morte celular coexistem^{21, 62} ou ocorrem em seqüência, dependendo da natureza e da severidade da agressão, e na dependência da condição da célula afetada.¹⁰

Estudos prévios, usando modelos de isquemia e reperfusão hepática normotérmica, têm demonstrado que ambas populações de células hepáticas sofrem apoptose após a reperfusão, com um máximo de lesão observado em 3 horas após a reperfusão. Esse tipo de lesão ocorre precocemente, bem antes da evidência da necrose, que foi aparente somente de 6 a 24 horas após cirurgia.^{20, 52, 54} Helling e cols.⁶³ recentemente demonstraram, em um modelo experimental em suínos, que células apoptóticas detectáveis dobraram quando a reperfusão foi prolongada de 60 minutos para 2 ou 4 dias. Makoto e cols.⁶⁴ em um modelo experimental, também em suínos, de isquemia prolongada (180 minutos), seguida por um período de reperfusão, concluíram que o modo principal de morte celular durante a lesão de isquemia e reperfusão hepática normotérmica foi a necrose, e a apoptose não foi dominante. A apoptose apresentou um pico 6 horas após a reperfusão, e decresceu gradualmente após esse período. Contrariamente, a necrose apareceu a partir de 9 horas da reperfusão e aumentou gradualmente até 24 horas após a reperfusão.

Schulz e cols.⁵ em outro modelo experimental em suínos, com isquemia prolongada (120 minutos), seguida de 480 minutos de reperfusão, precedida de condicionamento isquêmico, demonstraram que menos de 1% dos hepatócitos foram necróticos ou apoptóticos. Similarmente, neste estudo, a necrose foi mínima em todos os grupos; porém, as células apoptóticas foram mais freqüentes após 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Esses resultados poderiam ser principalmente explicados pela duração da reperfusão, mais do que pela duração da isquemia *per se*. Portanto, embora nossos dados também sugiram que a apoptose é a principal modalidade de morte celular na fase precoce da reperfusão hepática, o número absoluto de células apoptóticas e a quantidade de células necróticas podem ter sido

subestimados devido ao curto período de reperfusão utilizado nesse modelo experimental (180 minutos).

Concluindo, o condicionamento isquêmico é um mecanismo de proteção hepática e foi claramente demonstrado durante a fase precoce da reperfusão nesse modelo experimental. O condicionamento isquêmico parece induzir a um evento protetor intrínseco, e, com base nos dados do presente estudo, pode-se dizer que este método exerce efeito benéfico, rapidamente, na fase precoce da reperfusão. Tais dados foram evidenciados pela diminuição dos níveis séricos das aminotransferases, pelo aumento da produção de bile na reperfusão e inibição da atividade da caspase 3, resultando em inibição da apoptose. O mecanismo de proteção parece decorrer da melhor preservação da ultra-estrutura mitocondrial. Novos estudos deveriam investir na identificação de eventos celulares, em métodos e/ou em novos agentes farmacológicos que resultassem em estabilização da estrutura mitocondrial durante a lesão de isquemia e reperfusão, particularmente a transição da permeabilidade mitocondrial.

Tabela 1 – Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico sobre os níveis séricos da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e na produção de bile.

Característica	Grupo			P
	controle n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo PCI+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	
AST pré-isquemia (UI/L)	37,7±14,6	32,3±14,9	39,2±13,0	0,69
AST 180 min de reperfusão (UI/L)	46,2±23,7 ^a	702,2±118,1 ^c	431,3±122,0 ^b	<0,01
ALT pré-isquemia (UI/L)	31,3±4,4	23,7±7,9	31,3±6,9	0,10
ALT 180 min de reperfusão (UI/L)	27,0±6,9 ^a	57,2±17,5 ^b	59,2±25,4 ^b	0,01
Produção de bile (mL/180min de reperfusão)	49,3±8,4 ^c	5,3±3,3 ^a	21,2±6,9 ^b	<0,01

$\bar{X} \pm DP$: média±desvio padrão; ANOVA seguido pelo teste de Tukey; P<0,05

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa ao teste de *post-hoc*; Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

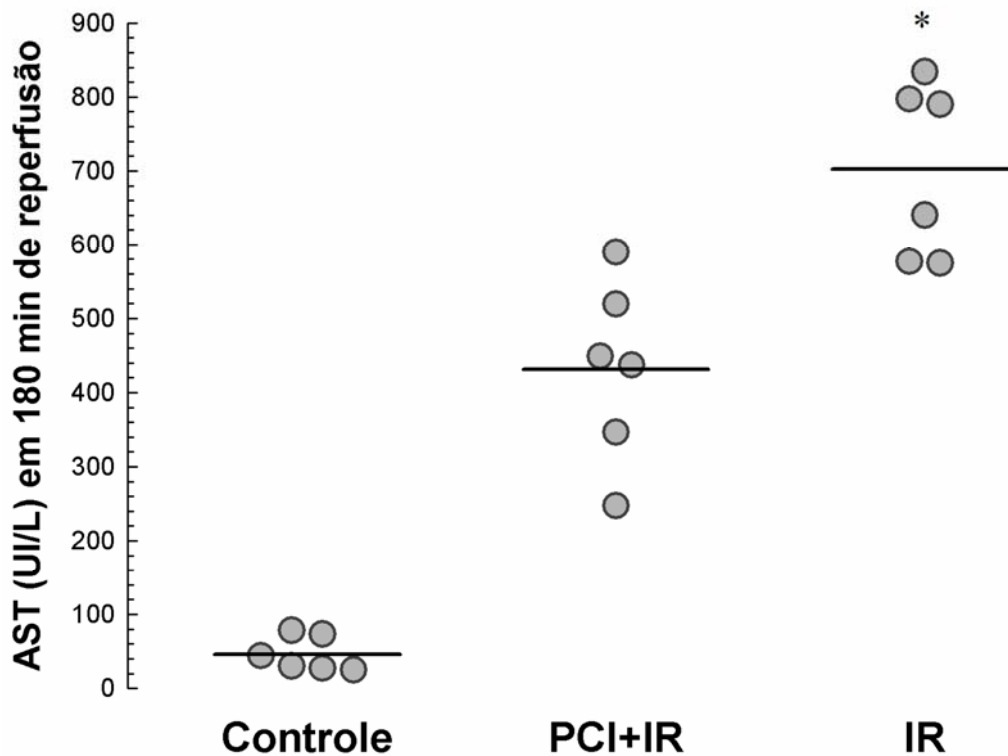


Figura 1 – Níveis séricos de asparatato aminotransferase (AST), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. *Os níveis de AST foram mais elevados no grupo IR em relação ao grupo PCI+IR e em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$.

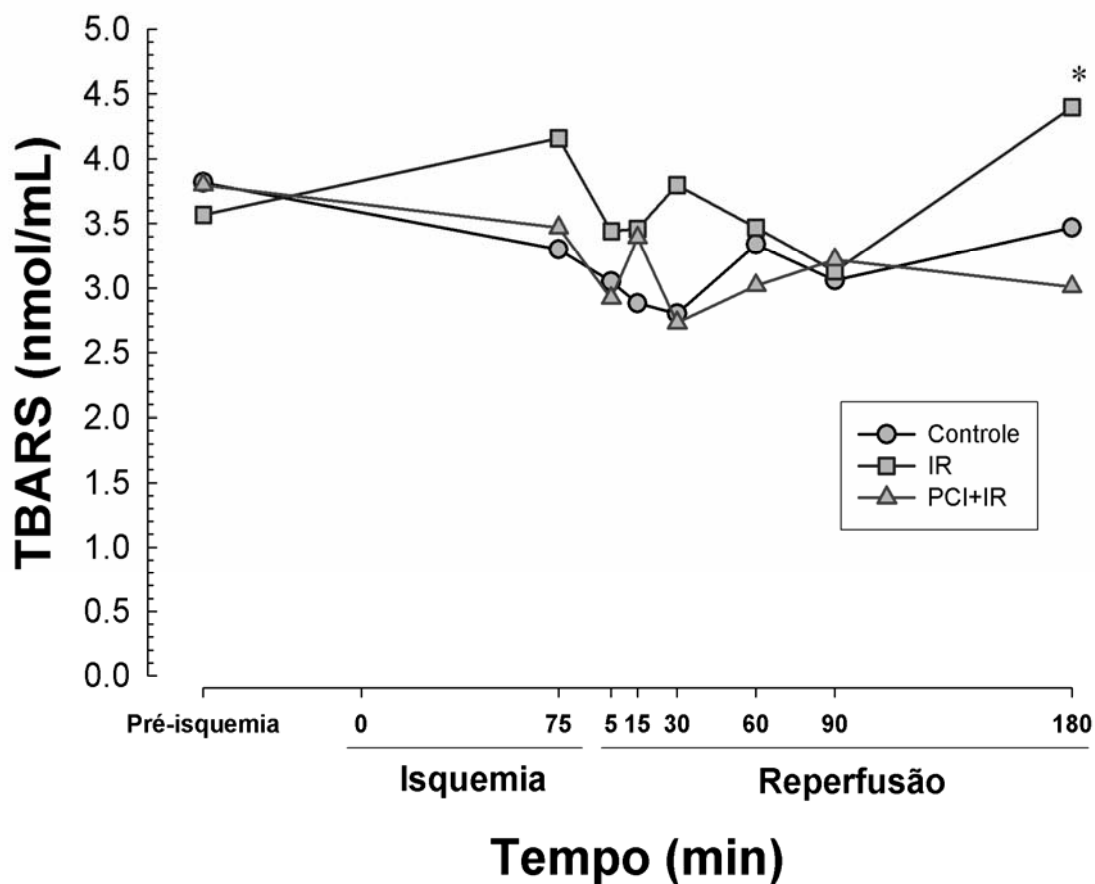


Figura 2 – Níveis séricos médios das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em um modelo de isquemia e reperusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. *Os níveis séricos do TBARS foram significativamente maiores nos 180 minutos de reperusão no grupo IR versus o grupo PCI+IR ($P=0,05$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperusão. Análise de variância de medidas repetidas; $P<0,05$.

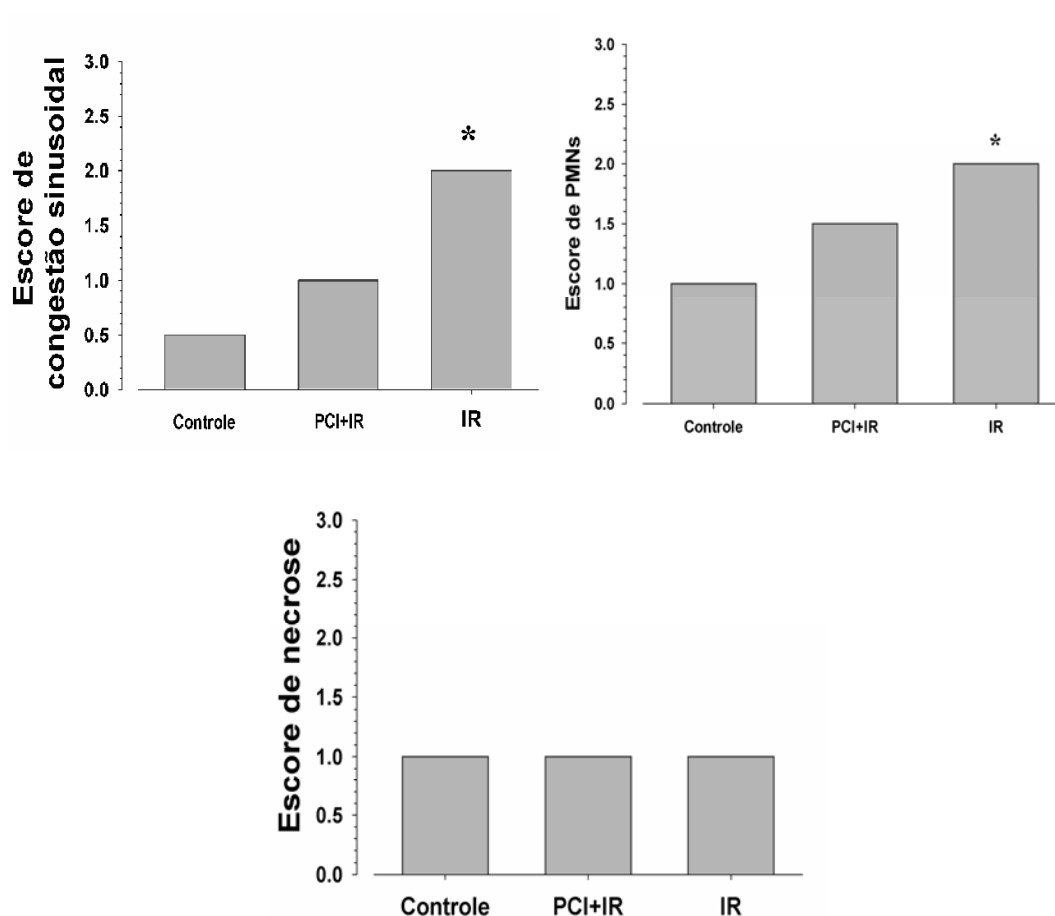


Figura 3 – Escore (mediana) de lesão hepática avaliada por meio da microscopia óptica, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. *A congestão sinusoidal foi significativamente maior no grupo IR versus grupo-controle ($P=0,02$). *A infiltração de polimorfonucleares (PMNs) foi significativamente maior no grupo IR versus o grupo-controle ($P=0,01$). A necrose não foi diferente entre os três grupos ($P=0,24$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Os escores foram ordenados em postos e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey; $P<0,05$.

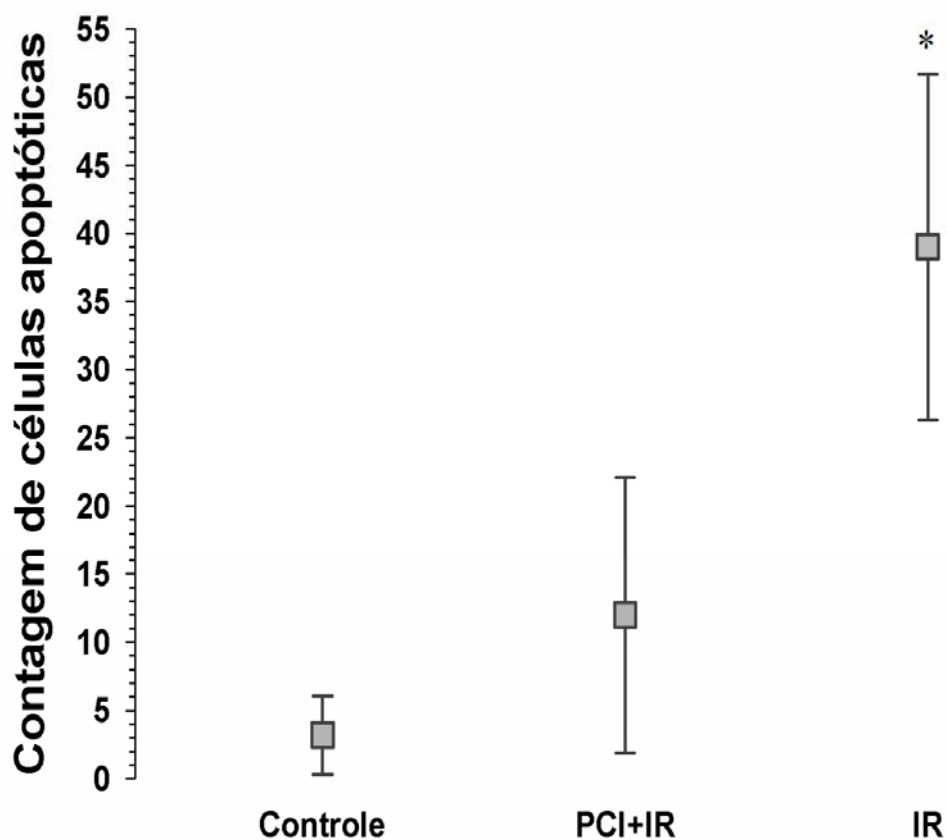
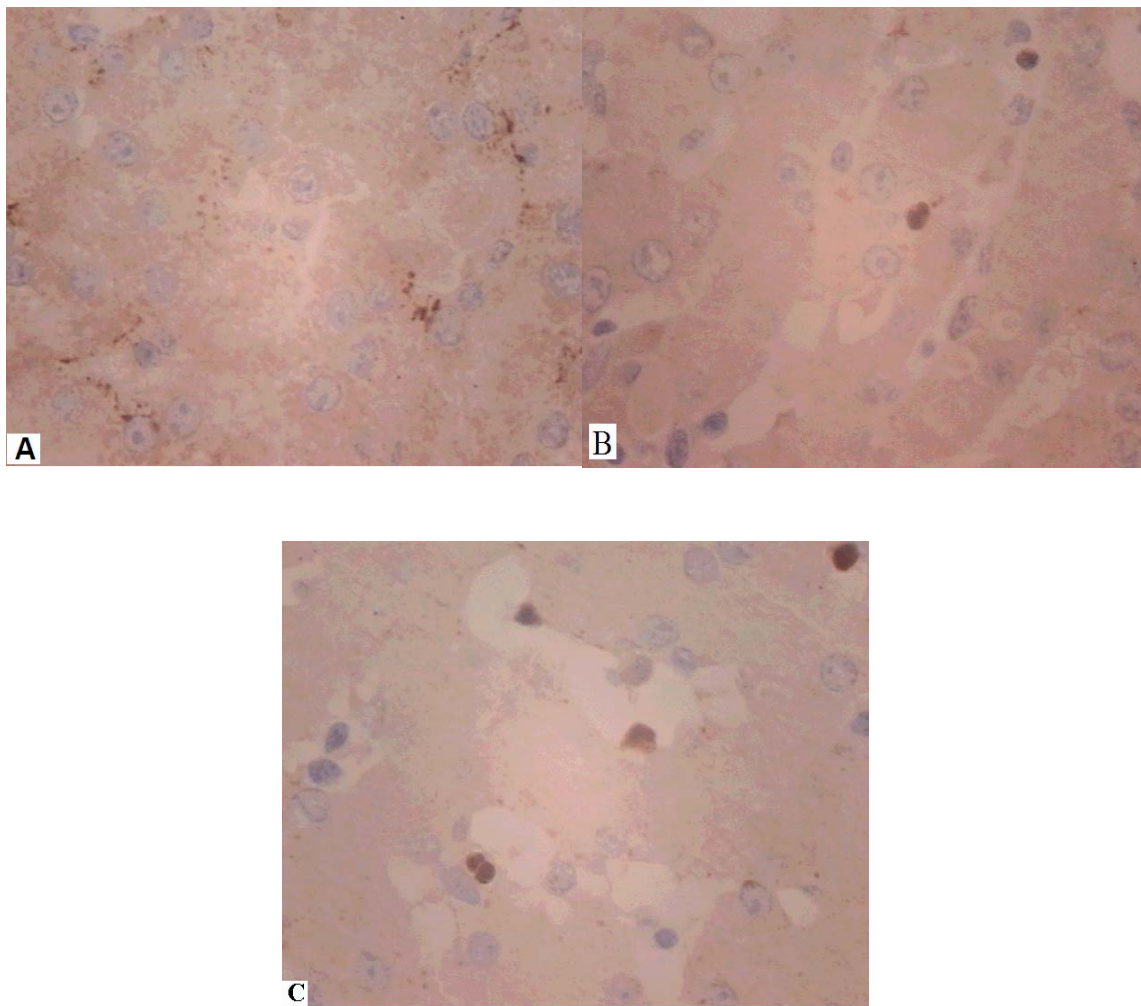
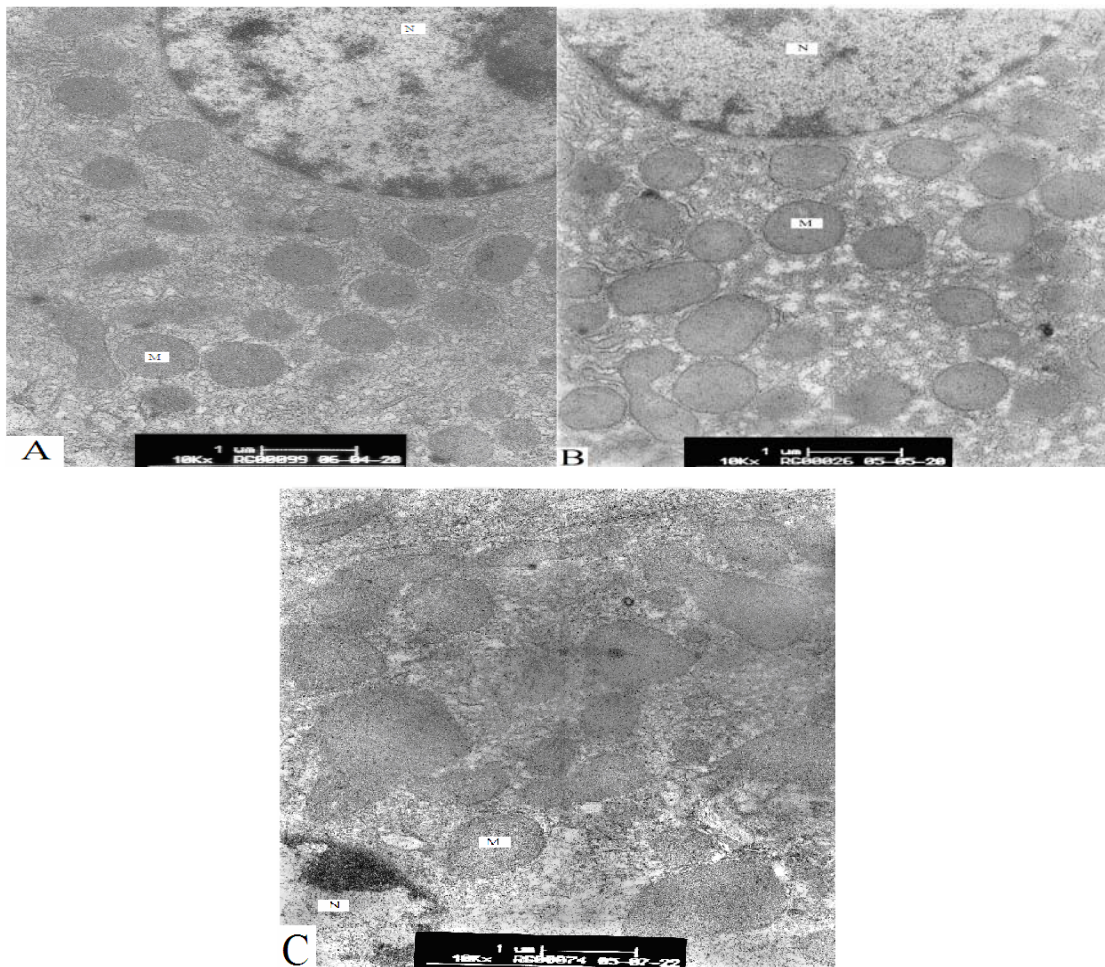


Figura 4 – Escore total das células apoptóticas (hepatócitos + células sinusoidais), avaliado pela técnica imunohistoquímica pelo anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) ao microscópio óptico, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. *O escore total de células apoptóticas no grupo IR ($39,0 \pm 12,7$), foi significativamente maior que o encontrado no grupo PCI+IR ($12 \pm 10,1$) e que o encontrado no grupo-controle ($3,2 \pm 2,9$) ($P < 0,01$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$.



Fotos 5A, B, C – Imunoistoquímica representativa de amostra do tecido hepático corado pelo anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) ao microscópio óptico (ampliação 400x), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. A) grupo controle, hepatócitos e células sinusoidais não demonstram atividade da caspase 3; B) grupo PCI+IR, raros hepatócitos e células sinusoidais apoptóticas; C) grupo IR, várias células sinusoidais e hepatócitos apoptóticos. Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.



Figuras 6A, B, C – Fotos representativas da ultra-estrutura das mitocôndrias de amostras do tecido hepático a microscopia eletrônica (magnification x 10000), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. A) grupo-controle, estrutura mitocondrial normal; B) grupo PCI+IR, mitocôndrias levemente edemaceadas, membrana mitocondrial visível, alguns vacúolos; C) grupo IR, mitocôndrias edemaceadas, disformes, membrana mitocondrial pouco visível, algumas parcialmente rompidas, dificuldade de visualização das cristas e presença de grande quantidade de vacúolos no citoplasma. Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. M: mitocôndria; N: núcleo.

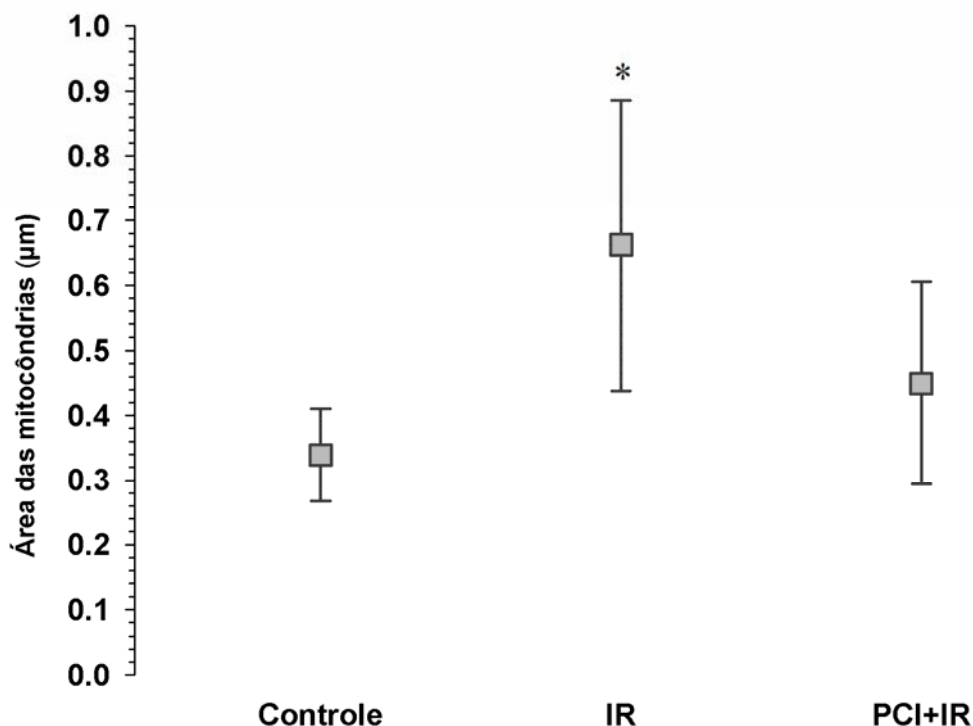


Figura 7 – Edema mitocondrial calculado pela média da área de 10 mitocôndrias próximas ao núcleo, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico. *A área das mitocôndrias foi estatisticamente maior no grupo IR ($0,6623 \pm 0,2241 \mu\text{m}$) em relação ao grupo-controle ($0,3391 \pm 0,0714 \mu\text{m}$) e em relação ao grupo PCI+IR ($0,4493 \pm 0,1456 \mu\text{m}$), ($P < 0,01$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$

Referências

1. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;**20**(5): 383-396.
2. Tsai BM, Wang M, March KL, Turrentine MW, Brown JW, Meldrum DR. Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 2004;**21**(3): 195-209.
3. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;**238**(6): 843-850; discussion 851-842.
4. Adam R, Arnault I, Bao YM, Salvucci M, Sebagh M, Bismuth H. Effect of ischemic preconditioning on hepatic tolerance to cold ischemia in the rat. *Transpl Int* 1998;**11 Suppl 1**: S168-170.
5. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**(1): H198-207.
6. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;**235**(3): 400-407.
7. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P, Lemoine A, Adam R, Castaing D. 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;**202**(2): 203-211.
8. Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L, Bloch P, Aranda A, Boschhat M, Huguet C. An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1980;**150**(6): 859-864.
9. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg* 2006;**19**(2): 113-123.

10. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 149-159.
11. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;**74**(5): 1124-1136.
12. Dekker LR. Toward the heart of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1998;**37**(1): 14-20.
13. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000;**86**(3): 263-275.
14. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. 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;**29**(1): 126-132.
15. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;**32**(2): 297-302.
16. 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;**16**(12): 1654-1656.
17. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;**73**(8): 1203-1211.
18. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002;**36**(1): 78-84.
19. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;**9**(1): 35-49.

20. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;**30**(5): 1223-1231.
21. Murphy A. Potential Mechanisms of Mitochondrial Cytochrome-c Release During Apoptosis. *Drug dev res* 1999:18–25.
22. Hubbard WJ, Bland KI, Chaudry IH. The role of the mitochondrion in trauma and shock. *Shock* 2004;**22**(5): 395-402.
23. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996;**184**(4): 1331-1341.
24. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;**275**(5303): 1132-1136.
25. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock* 2005;**24**(4): 370-375.
26. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;**183**(4): 1533-1544.
27. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;**140**(6): 1485-1495.
28. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002;**8**(11): 990-999.
29. Wills ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966;**99**(3): 667-676.
30. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;**32**: 279-312.

31. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;**105**: 121-126.
32. Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;**10**(13): 1934-1938.
33. Burra P, Chirizzi L, Cardin R, Cadrobbi R, Baldan N, Calabrese F, Pettenazzo E, Calo L, Plebani M, Rigotti P. Warm hepatic ischemia in pigs: effects of L-arginine and oligotide treatment. *J Invest Surg* 2001;**14**(6): 303-312.
34. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;**17**: 208-212.
35. Altman DG. Statistics in medical journals: developments in the 1980s. *Stat Med* 1991;**10**(12): 1897-1913.
36. van Wagensveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, Gouma DJ. Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 376-384.
37. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 369-375.
38. Man K, Lo CM, Liu CL, Zhang ZW, Lee TK, Ng IO, Fan ST, Wong J. Effects of the intermittent Pringle manoeuvre on hepatic gene expression and ultrastructure in a randomized clinical study. *Br J Surg* 2003;**90**(2): 183-189.
39. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987;**42**(5): 565-569.
40. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;**4**(5): 749-758.
41. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002;**74**(7): 905-912.

42. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;**85**(12): 1636-1640.
43. Halliwell BG, J.M Free Radic. Biol. Med. In: *Free Radicals in Biology and Medicine 3 ed* Claredon (ed): Claredon, Oxford. , 1999; 105 – 150.
44. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 127-140.
45. Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic Biol Med* 1994;**16**(6): 763-770.
46. Jaeschke H, Kleinwaechter C, Wendel A. The role of acrolein in allyl alcohol-induced lipid peroxidation and liver cell damage in mice. *Biochem Pharmacol* 1987;**36**(1): 51-57.
47. Jaeschke H, Kleinwaechter C, Wendel A. NADH-dependent reductive stress and ferritin-bound iron in allyl alcohol-induced lipid peroxidation in vivo: the protective effect of vitamin E. *Chem Biol Interact* 1992;**81**(1-2): 57-68.
48. 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;**145**(6): 1421-1431.
49. Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;**56**(1): 24-31.
50. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000;**25**(7): 319-324.
51. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 1999;**46**(2): 223-237.
52. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(6): 1652-1660.

53. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *Faseb J* 1999;**13**(2): 253-261.
54. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;**67**(8): 1099-1105.
55. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;**281**(5381): 1312-1316.
56. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;**275**(5303): 1129-1132.
57. Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien PA. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 1999;**68**(1): 136-140.
58. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997;**183**(4): 477-485.
59. Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S. Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;**281**(4): G1115-1123.
60. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;**33**(2): 397-405.
61. Kimura H, Katsuramaki T, Isobe M, Nagayama M, Meguro M, Kukita K, Nui A, Hirata K. Role of inducible nitric oxide synthase in pig liver transplantation. *J Surg Res* 2003;**111**(1): 28-37.

62. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;**276**(1 Pt 1): G1-6.
63. Helling TS, Edwards CA, Helling TS, Jr., Chang CC, Hodges MC, Dhar A, VanWay C. Hepatic apoptotic activity following transient normothermic inflow occlusion and reperfusion in the swine model. *J Surg Res* 1999;**86**(1): 70-78.
64. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, Matsuno T, Nui A, Hirata K. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 2002;**73**(9): 1439-1446.

7. 2. Versão em inglês

**HEPATIC ISCHEMIC PRECONDITIONING IS ASSOCIATED WITH
REDUCTION OF ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY BY PRESERVATION OF
MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND DOWNREGULATION OF CASPASE 3
ACTIVITY**

Rafael Omar Giovanardi, MD¹

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD²

Carlos Thadeu Cerski, MD, PhD³

Miriam Salvador, PhD⁴

From Post-graduating Course of Medical Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

¹ Professor of Department of Surgery at University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

² Professor of Post-graduating course of Medical Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³ Professor of Pathology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

⁴ Professor of Department of Biochemistry at University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

Correspondence and reprints requests: Rafael Omar Giovanardi, Departamento de clínica cirúrgica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil. Rua vinte de Setembro, 1695, Caxias do Sul, RS, Brasil. CEP 95020-450. Fone/Fax: 55 54 3223 1257.

Key words: liver injury, ischemia/reperfusion, preconditioning, apoptosis.

Running Title: Ischemic preconditioning protects liver from ischemia/reperfusion.

ABSTRACT

AIM: The beneficial effects of ischemic preconditioning (IPC) on hepatic ischemia-reperfusion injury have been described, although the link between IPC, apoptosis/necrosis and changes of the structure of mitochondria in hepatic ischemia/reperfusion injury is not well established. This study investigated the effect of IPC on early phase of post-ischemic liver injury in a pig model, particularly on liver morphology, apoptosis/necrosis and on the changes of the structure of mitochondria.

METHODS: A pig model of 90 minutes of hepatic ischemia and 180 minutes of reperfusion under passive venovenous bypass was established. Eighteen female hybrid pigs were randomly divided into sham-operated group, non-preconditioning group and ischemic preconditioning group (10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion). Serum concentration of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and serum activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. The bile flow was continuously measurement. Liver biopsies were taken at 180 min after reperfusion for histological and ultrastructural examination. Apoptotic cells were measured by immunohistochemical technique (anti-caspase-3). Mitochondrial ultrastructure was observed by electron microscope.

RESULTS: The IPC procedure increased bile flow ($P<0.01$) and improved serum AST level ($P<0.01$) when compared with non-preconditioning group. The serum concentration of TBARS in ischemic preconditioning group was significantly reduced only at 180 minutes of reperfusion ($P=0.05$), while the activity of antioxidant enzymes CAT was significantly higher in ischemic preconditioning group at 60 ($P=0.02$) and 180 minutes ($P<0.01$) of reperfusion. The sinusoidal congestion ($P=0.02$) and infiltrating polymorphonuclear leukocytes (PMNs) ($P=0.01$) in the sinusoids were statistically more evident in the non-preconditioning group only when compared with sham operated group. Under light microscope, anti-caspase-3 staining indicated that cell injury occurred primarily in the form of apoptosis at the early stage of reperfusion and the ischemic preconditioning group showed approximately 3-fold less caspase-3 activity when compared with

the non-preconditioning group ($P < 0.01$). The injury of mitochondrial ultrastructure in ischemic preconditioning group was also obviously reduced ($P < 0.01$).

CONCLUSION: In this study, we showed that apoptosis was a prominent feature of ischemia/reperfusion injury of the liver cells in the early phase of reperfusion and the IPC procedure inhibited apoptosis of the liver cells which was associated with better preservation of mitochondria structure and inhibition of caspase-3 activity.

INTRODUCTION

Hepatic ischemia and reperfusion is a common problem in many clinical and surgical conditions such as hepatic failure after shock, liver surgery for trauma or cancer and liver transplantation. A strategy that could be applicable to liver surgery and transplantation is ischemic preconditioning. Ischemic preconditioning is a short period of ischemia followed by a brief period of reperfusion before a sustained ischemic insult.¹ Ischemic preconditioning has been shown to attenuate the tissue injury observed after reperfusion of the heart, brain, skeletal muscle, spinal cord, kidney, intestine,^{1, 2} in experimental studies on hepatic vessel interruption as well as in liver surgeries in humans.^{1, 3} Although a large body of evidence favor liver protection by ischemic preconditioning from injury in both warm and cold ischemia, some studies have suggested that hepatic ischemic preconditioning may have only a limited benefit.⁴⁻⁶ Moreover, quite recently, the report by Azulay et al.⁷ did not demonstrate any beneficial results of ischemic preconditioning after hepatectomy under vascular exclusion of the liver in humans.

The effects of ischemic preconditioning in the liver have been demonstrated in several species including rodents and pigs, as well as in human beings. Although most of the data available in the literature have been derived from rodents,¹ it must be recognized that extrapolation of the results to larger species and humans is limited.¹ There are several similarities between the pig and human liver regarding physiology and anatomy; which make pig livers more appropriate than rats for experimental studies in this field.^{8, 9} However, as in humans, there is lack of data regarding hepatic ischemic preconditioning in pigs in the literature.¹

The potential benefits of ischemic preconditioning have been suggested for several organs, although the underlying mechanisms involved in this phenomenon remains uncertain.^{1, 10} Ischemic preconditioning has been described as an endogenous adaptive mechanism to prevent injuries resulting from ischemia reperfusion.¹¹ Based on studies on preconditioned myocardium, it is

widely accepted that ischemic preconditioning is mediated via a receptor-targeting mechanism.^{12, 13} Molecules released during ischemia attach to cellular receptors and contribute to preconditioning response. Several protective mediators have been proposed and investigated in liver ischemic preconditioning including adenosine,^{14, 15} nitric oxide (NO),^{14, 16} oxidative stress,^{17, 18} modulation of apoptosis cascade through down-regulation of of cysteine proteases known as caspases and inhibition of the release of cytochrome c from the mitochondria,¹⁹⁻²¹ and countless others.

In this context, mitochondria seem to be a target of ischemia and reperfusion injury, and their dysfunction, in turn, is a major pathogenic factor.²² Mitochondria as one of the cell organelles play an important role in providing energy, adjusting osmotic pressure, calcium balance and pH value, and cell signaling. Mitochondria produce ATP and reactive oxygen species which are also known as signals regulating gene expression and triggering cell death.^{23, 24}

Reperfusion of the ischemic tissue has been implicated with oxidative modifications and functional impairment of mitochondria²⁵ which ultimately results in the loss of mitochondrial integrity, particularly damage to the mitochondrial permeability transition (MPT) characterized by swelling.²⁵ It has been proposed that the MPT is responsible for apoptogen release in at least a large subset of pathologic conditions that involve apoptotic death, including ischemia and reperfusion injury.²¹ These apoptogenic factors clearly include the electron-transport protein cytochrome-c^{21, 26} and may also include protease(s),²⁶ including those of the caspase family.²⁷ Beneficial effects of ischemic preconditioning improving lipid peroxidation of the mitochondrial membrane,^{25, 28} damage to the mitochondrial integrity, particularly the MPT^{21, 25} and the energy metabolism have been suggested.²⁵

Although the beneficial effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia and reperfusion injury have been described, the link between ischemic preconditioning, apoptosis/necrosis and changes in the structure of mitochondria in hepatic ischemia and reperfusion injury is not well established and was rarely

reported in large animals. Therefore, this study investigated the effect of ischemic preconditioning on the early phase of post-ischemic liver injury in pigs, particularly on liver morphology, apoptosis/necrosis and on changes in the mitochondrial structure.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Operative Procedures

This study was approved by the Bioethics committee of the University of Caxias do Sul and was performed in compliance with ethical guidelines for animal studies. Eighteen female hybrid pigs weighing 18 to 23 kg were used. After overnight fasting, the animals were anesthetized with thiopental sodium (Cristália, Brazil) (0.5 mg/kg, intravenously) after sedation with ketamine hydrochloride (Cristália, Brazil) (2.0 mg/kg, intramuscularly) and atropine sulfate (Cristália, Brazil) (0.025 mg/kg, intramuscularly). The trachea was intubated for connection to a respirator (Takaoka model KT-13, serie Sansei plus, Brazil) and the animals underwent general anesthesia with a mixture of oxygen and isoflurane (Isoforine - Cristália, Brazil). Through the cervical incision, the right carotid artery and both internal jugular veins were isolated. The artery was cannulated with a polyethylene catheter for the measurement of mean arterial pressure. The jugular veins were cannulated for volume replacement using warmed 0.9% saline and for the measurement of central venous pressure. The temperature was monitored with a thermometer introduced through a small incision in the axial region. The temperature was kept above 37°C by the use of a heated drapes. The electrocardiogram and oxymetry were also monitored continuously during surgery. Through a midline incision, the liver was completely skeletonized by dividing all the hepatic suspensory ligaments. The portal vein, hepatic artery, and common bile duct were isolated, and their collaterals were separately occluded. Hepatic ischemia was induced by clamping the portal vein and the hepatic artery

under extracorporeal circulation. The venovenous bypass was used through the splenic vein to the left internal jugular vein with a polyethylene tube without a pump. The bypass was maintained under conditions of systemic heparinization (2,000 units) 5 minutes before ischaemia. The common bile duct was cannulated and drained to an unpressurized reservoir for continuous measurement of the bile flow; the cystic duct was occluded. Hepatic ischemia was maintained for 90 min, and then reperfusion was subsequently performed by releasing the clamp. Congestion of the small intestine was not observed macroscopically during the experiment. No animals received vasopressor drugs and the pigs were killed 3 hours after reperfusion.

Blood samples (5ml) were obtained in heparinized tubes at the beginning of laparotomy; before reperfusion (at 75 minutes of ischemia); at 5, 15, 30, 60, 90 and 180 min after reperfusion. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum concentration of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. Liver biopsies were taken at 180 minutes after reperfusion for histological and ultrastructural examination, and apoptosis evaluation.

Experimental Design

The pigs were randomly allocated to three study groups of six pigs each. Sham-operated group: the liver was exposed for 5 hours, (the animals were subjected to anesthesia, laparotomy and dissection of structures without hepatic ischemia and the liver remained exposed during 5 hours); non-preconditioning group (IR): animals subjected to 90 minutes of ischemia followed by a 180 min period of reperfusion; ischemic preconditioning group (IPC+IR): before 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a preconditioning protocol (10 minutes ischemia followed by 10 minutes reperfusion).

Biochemical Assessment of liver Cytolysis (Serum Enzyme Analysis)

Blood samples were obtained before ischemia and at the end of the reperfusion period. Blood was centrifuged and the plasma separated. Irreversible hepatic damage was evaluated by measuring alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The AST and ALT determinations were performed with the SELECTRA II Merck[®] automated system using the colorimetric enzymatic method with a commercial kit from Labtest Diagnóstica SA (Labtest Diagnóstica SA, Brazil). The results were expressed in UI/L.

Excretory Liver Function

Bile production, as a parameter of excretory liver function, was monitored continuously during the reperfusion period. The common bile duct was cannulated (the cystic duct was occluded) and drained to an unpressurized reservoir for continuous measurement of the bile flow, which was expressed as milliliters/3-hour reperfusion period.

Thiobarbituric acid reactive substances determination (TBARS)

The intensity of lipoperoxidation, as a result of oxidative stress produced by reactive oxygen radical, was measured spectrophotometrically by concentration of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Wills 1966.²⁹ TBARS results were expressed as nmol/mL. Blood samples were obtained from the venovenous shunt before ischemia, at the end of the ischemic period (at 75 minutes ischemia), 5, 15, 30, 60, 90 and 180 minutes after reperfusion.

Superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in serum samples by measuring the inhibition of the rate of auto-catalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/L adrenaline (pH 2.0)

and 50 mmol/L glycine (pH 10.2)³⁰, both from E. Merck. This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C during 3 minutes. The enzymatic activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein (U/g de proteína). One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%.

Catalase (CAT) activity

The assay was performed according to the method described by Aebi.³¹ The assay principle is based on the determination of the rate of hydrogen peroxide (E. Merck) decomposition at 240 nm. This reaction was conducted at a constant temperature (30°C) for 1 minute. The enzymatic activity is expressed as catalase units per mg of protein (U/mg de proteína). One unit of catalase decomposed 1 μ mole of H₂O₂ per min at pH 7.4 and 30°C.

Proteins

The total protein levels were analyzed by Biureto methods (Kit Proteínas Totais-Labtest Diagnostica S.A., Brazil), for spectrophotometrical determination in 545nm.

Histology and Immunohistochemistry Assessment

Liver biopsies were taken from each of the six animals in each group at 180 min after reperfusion for histological examination using light microscopy (Olympus BX 41, Japan). The light microscopy analysis was performed under haematoxylin and eosin (H&E) staining and we examined the mechanism by which ischemia/reperfusion influenced apoptosis after reperfusion using immunohistochemical methods (polyclonal anti-caspase-3 antibody) (D175, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA). A pathologist examined the slides without knowledge of the study groups.

Haematoxylin and Eosin (H&E): Biopsies were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Thin sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) for analysis of the sinusoidal congestion, cytoplasmic vacuolation, infiltrating polymorphonuclear leukocytes (PMNs), steatosis and liver necrosis. Morphologic criteria for necrosis such as increased cytoplasmic eosinophilia, vacuolization, cell disruption, loss of architecture, and nuclear changes consisting in pyknosis, karyorrhexis, or karyolysis were used to determine necrosis.²⁸

The extent of sinusoidal congestion, cytoplasmic vacuolation, infiltrating polymorphonuclear leukocytes (PMNs), liver necrosis and steatosis was assessed semiquantitatively as follows: Sinusoidal congestion (score 0 – 3): none = 0; mild (dilation of the centrilobular vein) = 1; moderate (dilation of the centrilobular vein plus sinusoidal dilation of zone 3) = 2; severe (dilation of the centrilobular vein + sinusoidal dilation of zone 3 and zone 2) = 3; Cytoplasmic vacuolation (score 0 – 3): none = 0; mild (rare perivenular hepatocytes) = 1; moderate (numerous perivenular hepatocytes) = 2; severe (alterations of the hepatocytes beyond zone 3) = 3; PMNs (score 0 - 4) none = 0; rare cells = 1; focal = 2; multifocal = 3; diffuse and uniformly intense = 4; Liver necrosis (score 0 – 4): absence of necrosis = 0; spotty necrosis (scattered necrotic hepatocytes at zona 3) = 1; focal necrosis (periportal or perivenular or midacinar necrosis) = 2; multifocal necrosis (necrosis in more than one acinar zone) = 3; lobular necrosis (necrosis bridging between vascular inflow and outflow structures – diffuse, zones 1,2,3) = 4; and Steatosis (score 0 – 3) <5% = 0; mild (33%) = 1; moderate (33% - 66%) = 2; severe (>66%) = 3.

Caspase-3 Activity Assay: Immunohistochemistry for cleaved caspase-3 was performed on samples of tissue from pig livers removed from each group after 180 minutes of reperfusion, fixed in formalin and embedded in paraffin. For immunohistochemical preparation, 5 micrometer section distributed on silanized slides were deparaffinized in xylene, hydrated in alcohol and pre-treated for antigen recovery in citric acid (pH 6.0) using a steamer at a temperature of 98°C for 20 minutes. The slides were incubated using cleaved anti-caspase-3 polyclonal antibody (D175, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) at a 1:300 dilution,

, na anti-IgG biotinilated secondary antibody of rabbit at a 1:320 dilution (BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), VECTASTAIN Elite ABC detection system kit (PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) and diaminobenzidine chromogen-DAB (D5637, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Positive (lymphoid tissue) and negative controls prove the faithfulness of the reaction. .

Morphometric analysis of the cells in tissue stained by the anti-caspase-3 method was performed under high-power magnification (x400) (Olympus BX 41, Japan). Positively labeled nuclei (brown color) were identified from negatively unstained nuclei (blue color). The number of positive nuclei was determined by counting all the positively labeled nuclei present in twenty random visual fields for each anti-caspase-3 stained tissue sample under a microscope. The assessment included the count of 10 portal spaces (one portal space per field, using the portal space as a central reference, prioritizing the septal region to increase the number of cells counted), and 10 centrolobular veins (one centrolobular vein per field, using as central reference the terminal centrolobular vein), which meant a total area of 360 mm² (18 mm²/field). The apoptotic cells had the following characteristics: single cells, no inflammation, curling of cell membrane, brown particulate or fragmented nuclei, as previously described.³² The numbers of hepatocytes and apoptotic sinusoidal lining cells (SLCs) were counted independently and scored semiquantitatively by averaging the number of apoptotic cells by the total area of field analyzed (including portal zone, centrolobular zone and portal zone + centrolobular zone). Hepatocytes were clearly identified as a specific population of cells; however, SLCs included endothelial cells, Kupffer cells, and possibly adherent neutrophils. The cells that showed a brown color in the cytoplasm and free positive cells inside the sinusoids (lymphocytes and PMNs) were not considered positive for the caspase-3 marker. The presence of areas of marked lymphocytic infiltration or necrosis were removed to count apoptotic cells, as also previously described.³³

Electron Microscopy (Ultrastructural assessment)

Liver biopsies were taken from each of the six animals in each group at 180 min after reperfusion for electron microscopy. Two observed examined the slides without knowledge of the study groups.

One mm³ fresh hepatic tissue was immediately placed in a fixative solution with 2% glutaraldehyde. The samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide buffer, followed by a “em bloc” contrast stage, with 1% uranyl acetate. The dehydration was performed in gradual alcohol series. The pre-soaking of the material was done in a mixture of Epon 812 with pure acetone at the following proportions: 75%, 50%, 25%. Soaking was performed with pure Epon 812 for 24 hours. Polymerization was carried out in an oven at constant 60° C for 72 hours. The semithin sections were cut on the Leica Ultracut UCT 2.0 ultramicrotome, using a diamond razor, with a thickness of 800 nm and stained with an aqueous solution of 1% toluidine blue + basic fuchsin. The ultrathin sections were cut with a 70 nm thickness on the same ultramicrotome, with a “Durkcker type histo with trough 3mm” diamond razor. Ultrathin sections stained with a metanilic uranyl solution and then lead citrate.³⁴ The changes in ultrastructural organization were examined through an EM208S Philips transmission electron microscope (Philips Electronic Instruments Inc, Eindhoven, Holland) with an 80-kV acceleration voltage, at the Electron Microscopy Laboratory at Universidade Luterana do Brasil – ULBRA/RS.

Mitochondrial swelling: The ultrastructural modifications of the mitochondria were assessed to determine the presence of mitochondrial swelling and changes in the mitochondrial membrane. The mitochondrial swelling was assessed semiquantitatively by the mean of the measure of the areas of 10 mitochondria close to the nucleus of each animal using Carnoy v. 2.0 software (<http://www.carnoy.org>) following the formula of the area of the ellipse: $A = \pi ab$; where (a) is the large semidiameter and (b) the small semi-diameter. Two observed examined the slides without knowledge of the study groups. The results were expressed in μm .

Statistical analysis

Considering that there was no interest in testing differences with magnitudes of effect equal to or larger than two standard deviation units ($E/S \geq 2$), it was estimated that with six (6) animals per group we would obtain a statistical power of approximately 90% at an $\alpha=0.05$ level of significance. The data were described by mean and standard deviation, and when the scale scores did not have much amplitude, the median and minimum and maximum values were chosen. The evolution of the TBARS, SOD and CAT values was assessed by a model of repeated measures analysis of variance. The other comparisons, involving specific moments, were assessed by one-way ANOVA, differences being found by Tukey test. The scores were Rank transformed prior to analysis and comparisons were conducted via ANOVA followed by Tukey post hoc procedure. The level of significance adopted was $\alpha=0.05$, and the data were analysed using the SPSS version SPSS versão 12.0 and SigmaPlot version 8.0 program.³⁵

RESULTS

Liver Enzyme Analysis

Changes in serum aminotransferases after reperfusion of livers subjected to ischemia are summarized in Table 1. After 3 h of reperfusion, the serum AST and ALT levels in the sham-operated animals did not change during the time of the experiment. In the non-preconditioning group, the serum AST and ALT levels increased to approximately 15 and 2 times that observed in the sham group 3 h after reperfusion, respectively. These increases were significantly suppressed by the ischemic preconditioning group (Figure 1).

Excretory Liver Function

After 180 minutes of reperfusion, bile production was almost completely stopped in non-preconditioning group (5.3 ± 3.3 ml), on the other hand, bile production in the ischemic preconditioned group (21.2 ± 6.9 ml) reached approximately half of the volume produced by the sham-operated group (49.3 ± 8.4 ml) (Table 1 - $P < 0.01$).

TBARS levels and Antioxidant enzyme activity

Although we observed higher levels of TBARS after 180 minutes of reperfusion in non-preconditioning group (4.40 ± 1.25), compared with the ischemic preconditioning group (3.01 ± 0.39) ($P = 0.05$), this was not observed for the sham-operated group (3.47 ± 0.81) (Figure 2).

The activity of SOD also did not differ among the three groups in any of the samples, while the activity of CAT was significantly higher ischemic preconditioning group (4.01 ± 2.73) when compared with the non-preconditioning group (1.02 ± 0.83) and sham-operated group (1.20 ± 0.72) 60 minutes after

reperfusion ($P=0.02$). These was also found 180 minutes after reperfusion (4.40 ± 1.80 IPC vs. 1.0 ± 0.44 IR vs. 1.10 ± 1.40 Sham group; $P<0.01$).

Histological Findings

Light microscopic evaluation of the liver biopsies obtained at the end of 180 minutes of reperfusion showed only minor alterations in all groups. Steatosis was less than 5% in all groups ($P=0.39$), cytoplasmic vacuolation was present in rare perivenular hepatocytes ($P=0.24$) and, in all groups, liver necrosis was absent or only scattered necrotic hepatocytes were found ($P=0.32$). The sinusoidal congestion and infiltrating PMNs in the sinusoids were statistically more evident in the non-preconditioning group when compared with sham-operated group ($P=0.02$ and $P=0.01$, respectively) (Figure 3).

Caspase-3 Activity

Under light microscopy, anti-caspase-3 staining indicated that cell injury occurred primarily in the form of apoptosis at the early stage of reperfusion and apoptotic cells were found in the same proportion between centrolobular zones and the portal zone in each group ($P>0.05$) (Figure 4A, B, C).

Livers subjected to ischemia and reperfusion without preconditioning showed approximately 3-fold greater caspase-3 activity when compared with the ischemic preconditioning group. The total score of apoptotic cells (centrolobular + portal zone) in the non-preconditioning group was significantly higher than that in ischemic preconditioning and sham operated group (39.0 ± 12.7 vs. 12.0 ± 10.1 vs. 3.2 ± 2.9 ; $P<0.01$), respectively. The score of apoptotic cell per zone (centrolobular and portal) was also significantly higher in the non-preconditioning group (21.8 ± 7.7 and 17.2 ± 8.0) than that in the ischemic preconditioning (6.3 ± 5.7 and 5.7 ± 4.9) and sham-operated group (1.8 ± 1.5 and 1.5 ± 1.6) ($P<0.01$) (Figure 5). In the ischemic preconditioning group, we did not find a difference in caspase-3 activity between hepatocytes and SLCs in the centrolobular zone (2.0 ± 2.2 vs. 4.0 ± 3.6 ; $P=0.14$), but a difference was found in caspase-3 activity between the

hepatocytes and SLCs in the portal zone (1.0 ± 1.5 vs. 4.7 ± 3.7 ; $P=0.02$). In the non-preconditioning group, the number of apoptotic SLCs was significantly higher than apoptotic hepatocytes, both in the centrilobular zone (14.8 ± 6.7 vs. 5.7 ± 1.8 ; $P=0.02$) and in the portal zone (12.5 ± 5.5 vs. 4.7 ± 3.8 ; $P=0.01$).

Ultrastructural changes of mitochondria and quantitative analysis of swelling

In the sham-operated group, the mitochondrial structure was normal. Mitochondria arranged in an orderly manner in a round or ellipsoid form without swelling. The mitochondrial membrane was intact and cristae were arranged in the form of a concentric ring or vertical line, congested and clear. In the non-preconditioning group, mitochondria were swollen, their membrane was vague or partly ruptured and cristae were obviously loose and dissolved, a lot of vacuoles were formed. In the ischemic preconditioning group, the mitochondrial structure was better preserved (Figure 6A, B, C). The cross-sectional area of mitochondria were increased after reperfusion in non-preconditioning group ($0.6623 \pm 0.2241 \mu\text{m}$) against sham operated ($0.3391 \pm 0.0714 \mu\text{m}$) and ischemic preconditioning group ($0.4493 \pm 0.1456 \mu\text{m}$) ($P<0.01$) (Figura 7).

DISCUSSION

In the *in vivo* experimental model of liver reperfusion injury in pigs used in this study, the ischemic preconditioning conferred strong resistance to liver cell damage consequent to prolonged warm ischemia followed by tissue reoxygenation. We demonstrated improved liver function and preserved parenchyma integrity as a protective effect of ischemic preconditioning. The protective mechanisms underlying ischemic preconditioning increased the bile production, decreased in the serum AST level and resulted in the reduction of apoptosis of sinusoidal endothelial cells and hepatocytes. The damage to mitochondrial structure and caspase-3 activity, clearly visible soon after reperfusion, was prevented by the ischemic preconditioning procedure.

The hepatoprotective effect against warm ischemia/reperfusion injury was clearly demonstrated in the pigs pretreated with ischemic preconditioning. The significant reduction of AST levels measured 3 hours after reperfusion reflected the beneficial effects of preconditioning procedure in these *in vivo* ischemia/reperfusion injury models. Serum levels of AST were distinctly elevated in both groups submitted to ischemia-reperfusion injury, in contrast to levels of ALT, which, despite being significantly higher than in the sham-operated group, presented much lower serum levels. It seems that the lag time for release of ALT into the blood is longer than that of AST, as previously described.^{33, 36} Most clinical studies have used aminotransferase levels to assess hepatic injury resulting from ischemia.^{37, 38}

These enzymes are currently the most sensitive markers of ischemic injury to the liver, however, serum enzyme concentrations cannot easily be used as surrogate markers for the extent of irreversible damage in hepatic ischemia/reperfusion injury.⁵ Therefore, corroborating the reduction of serum AST levels, we demonstrated a significant increase of bile production in the ischemic preconditioning group. Bile production, as a parameter of excretory liver function, has also been described as a valuable parameter of ischemia-reperfusion injury

in the liver,³⁹ and bilirubin has been described as a potent physiological bile pigment with an antioxidant function that protects cells from oxidative injury.^{40, 41}

In this study, bile production in the sham-operated group remained constant throughout the experiment, and was almost completely stopped in both groups during ischemia (data not shown), whereas during the 3-hour reperfusion period, cumulative bile production remained severely depressed in the non-preconditioning group, and recovered in the ischemic preconditioning group. Similarly, in a previous study in anesthetized rats,⁴² and in a pig model,⁵ recovery of cumulative bile production was faster in the preconditioned than in the non-preconditioned livers.

Ischemic preconditioning has also shown beneficial effects during the early phase of reperfusion most probably by preventing the ischemia/reperfusion dependent exacerbation of oxidative stress and lipid peroxidation.^{17, 28} In this study, we found higher serum levels of TBARS after 180 min of reperfusion in the non-preconditioning group compared with the ischemic preconditioning group. We also showed a significant elevation of CAT at 60 and 180 minutes after reperfusion in the ischemic preconditioning group, which suggests a protective effect of ischemic preconditioning due to the increased activity of this antioxidant system, as well as the greater involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂) as reactive oxygen species mediating the cell lesion, as also shown previously.^{25, 28}

The significant elevation of CAT after only 60 min of reperfusion may be justified by the tendency to late modulation of this antioxidant in the liver, an organ where it has been described that the first enzyme to act in the dismutation of the hydrogen peroxide, (and also when at low concentrations) is peroxidase glutathione (GPx).⁴³ This information can only be inferred, since measuring the serum GPx levels was not the subject of this study.

Although damage to membranes by lipid peroxidation is one of the most popular hypotheses to explain injury by reactive oxygen species, other reactive oxygen-induced cell injury mechanisms appear to be more important, and lipid

peroxidation products may be involved in the amplification and extension of the inflammatory response.⁴⁴ Jaeschke et al.⁴⁴⁻⁴⁷ using different models of hepatic injury induction by lipid peroxidation in vivo observed that, where lipid peroxidation was the cause of cell death, a wide variety of lipid peroxidation parameters, such as ethane and pentane exhalation, hepatic malondialdehyde content, hepatic levels of hydroxy and hydroperoxy fatty acids, and isoprostanes, consistently increased by 20- to 50-fold above baseline.

On the other hand, in virtually all papers on hepatic ischemia/reperfusion injury, including these results (through serum level), lipid peroxidation parameters increased less than threefold above the baseline.⁴⁴ Thus, on a quantitative basis, we could also agree with Jaeschke et al.⁴⁴ when they say that it is very difficult to explain that severe injury during reperfusion could be caused by moderate lipid peroxidation.

Hepatic ischaemia and reperfusion may induce not only metabolic impairment but also morphological alteration of the liver. In previous models of liver ischemia/reperfusion,^{37, 48, 49} morphological evidence of cellular injury after prolonged ischaemia followed by reperfusion was demonstrated by light and electron microscopy. Under electron microscopy, injuries included alteration of non-parenchymal cells (swelling of sinusoidal lining cells and widening of the Disse space) and substantial parenchymal cell damage (swelling of mitochondria, derangement of rough endoplasmic reticulum, vacuolization and complete cytoplasmic degeneration).³⁷

In this study, electron microscopy analysis clearly revealed a marked degree of mitochondrial degeneration in non-preconditioned versus preconditioned livers. Ischemia/reperfusion in a non-preconditioned group caused an obvious disruption of mitochondrial structure characterized by swelling with loss of cristae, decrease of matrix density; further, some of this mitochondria showed blebs with rupture of the external membrane.

It was considered previously that the apoptotic cells manifested condensed chromatin but intact mitochondria, now much more evidence revealed that significant changes in mitochondria such as swelling, megamitochondria, mitochondrial pyknosis and disrupted outer-membrane could take place in many apoptotic models.^{50, 51} Indeed, the mitochondria play a critical decision-making role in the apoptotic cascade by controlling the release of those factors that stimulate the late steps of apoptotic death.²¹ These apoptogenic factors clearly include the electron-transport protein cytochrome-c^{21, 26} and may also involve protease(s),²⁶ including those of the caspase family.²⁷

The mechanism for which there is the most supporting evidence for apoptogen release is mitochondrial swelling that could be induced either by the permeability transition or by another permeability-altering event. As the permeability of the inner mitochondrial membrane is compromised, osmotic forces induce an increase in the matrix volume, ultimately rupturing the outer mitochondrial membrane.²¹ The method used in this study to quantify mitochondrial swelling by measuring the area of the ellipse was simple, quick and in accordance with the other results obtained in this study to quantify the liver cell injury. In other words, in the ischemic preconditioning group, the degree of mitochondrial swelling injury was obviously relieved and the SLCs and hepatocellular apoptotic score was also decreased, indicating that the structural and functional changes of mitochondria were correlated with the initiation and development of cell apoptosis. However, the exact mechanisms underlying this preconditioning-produced mitochondria protection remain unclear.

Knowledge on molecules and pathways involved in apoptosis is just emerging. The quantitation of apoptosis in the tissue was mainly based on TUNEL assay.⁵²⁻⁵⁴ Actually, the most investigated signaling pathway is the caspase cascade, and caspase activation remains a hallmark feature of apoptosis.^{55, 56} In fact, a large body of evidence exists to support caspase 3 as a distal effector protease in apoptosis and in directly inducing apoptosis.^{19, 56}

In the present study, using the anti-caspase-3 assay, we showed that the ischemic preconditioning reduces the amount of hepatocyte and sinusoidal lining cell apoptosis. In others words, the apoptotic cells were significantly increased in non-preconditioning livers compared with the ischemic preconditioning group (approximately 3-fold). In the preconditioning group, caspase-3 activity was steadily decreased to values statistically not different from those obtained in the liver of sham-operated animals. Similar results were observed by Yadav et al.²⁰ as assessed by specific enzymatic assay; the control livers subjected to 90 minutes of ischemia and 1 hour of reperfusion showed 3-fold greater caspase-3 activity when compared with the preconditioned livers. The chronology of cell death was not the main purpose of this study, but our data support sinusoidal endothelial cell susceptibility to apoptosis. We showed that the score of sinusoidal endothelial cells apoptotic was significantly higher than hepatocyte apoptotic cells. Previous data in the cold and warm ischemic liver suggested that the sinusoidal endothelial cell is the first cell type to undergo apoptosis after reperfusion.^{20, 52, 57}

The small number of animals studied (6 per group) is one of the main limitations of this study, and therefore it can be said that our data may have failed to find a statistically significant difference in the moderate and small effects. On the other hand, the statistically significant differences found in this study can safely be accepted.

Another possible limitation of this study may have been the method used to determine lipid peroxidation (serum dosage of malondialdehyde, by thobarbituric acid reactive substances), which did not show oxidative stress as the most important component of tissue injury, since the results of liver tests used in this study and the morphological assessment of the liver cells clearly showed the protection of ischemic preconditioning. Corroborating this hypothesis, studies using pharmacological preconditioning with L-arginine have demonstrated that there is no correlation between the tissue levels (significantly lower than those of the controls) and serum levels of malondialdehyde.^{33, 58} Moreover, the same studies and others using ischemic preconditioning have demonstrated

concordant results between the concentration of malondialdehyde and the activity of SOD and CAT in hepatic tissue and the results found in the function tests and hepatocellular morphological assessment.^{25, 33, 58} The importance of lipid peroxidation in the hepatic ischemia/reperfusion injury, as well as the correlation between serum and tissue levels of the lipid peroxidation parameters and the enzymatic antioxidant systems CAT and SOD represents an important area for future investigation.

This study was designed to observe the alterações of the liver cells that occurred in the early stage of reperfusion (beginning of reperfusion until the third or fourth hour), which may have underestimated findings, especially concerning the mode of cell death (apoptosis and/or necrosis). Recently, apoptosis has been indicated by some authors as a major mode of cell death during hepatic warm ischemia/reperfusion injury,^{52-54, 59} on the other hand, some reports concluded that the major mode of cell death during hepatic warm ischemia/reperfusion injury is necrosis rather than apoptosis.^{60, 61} In this context, it seems that both forms of cell death coexist^{21, 62} or occur serially, depending on the nature and severity of the insult and on the condition of the affected cell.¹⁰

Previous studies, using models of normothermic hepatic ischemia have shown that both populations of hepatic cells undergo apoptosis after reperfusion with maximal injury observed 3 hours after reperfusion. This type of injury occurred well before any evidence of necrosis, which was apparent only 6 to 24 hours after surgery.^{20, 52, 54} Helling et al.⁶³ recently demonstrated in a pig model that detectable amount of apoptotic cells was doubled when reperfusion was prolonged from 60 min to 2 or 4 days. Makoto et al.⁶⁴ in a pig model of long-term ischemia (180 minutes) followed by reperfusion concluded that the major mode of cell death during hepatic warm ischemia-reperfusion injury was necrosis, and apoptosis was not dominant. The peak phase of apoptosis was 6 hours after reperfusion and decreased gradually thereafter. Conversely, necrosis appeared 9 hrs after reperfusion and increased gradually to 24 hrs after reperfusion.

Schulz et al.⁵ in another pig model of long-term ischemia (120 min) followed by 480 min of reperfusion preceded by ischemic preconditioning demonstrated that less than 1% of hepatocytes were necrotic or apoptotic. Similarly, in the present study necrosis was absent or only scattered necrotic hepatocytes were found in all groups. On the other hand, apoptotic cells were dominant after 90 min of ischemia followed by 180 min of reperfusion. Such results could be explained mainly by the actual difference in the length of reperfusion and not due to duration of ischemia *per se*. Therefore, although our data further suggest that apoptosis is a key modality of cell death in the early postischemic liver, the absolute number of apoptotic cells and the amount of necrotic cells may have been underestimated due to the limited reperfusion period of 180 min in this study.

In summary, this study establishes that ischemic preconditioning is a powerful protective mechanism in the ischemic liver. Ischemic preconditioning appears to induce intrinsic protective events and based on the data of the present study it allows us to hypothesize that ischemic preconditioning exerts beneficial effects already during the early phase of reperfusion which was evident in terms of attenuated levels of plasma aminotransferases, increased cumulative bilirubin production and down-regulation of caspase-3 activity resulting in inhibition of apoptosis. The protection mechanism appears to occur through a much better preserved mitochondrial structure.

Future areas of investigation should focus on the identification of cellular events and methods or new therapeutic agents to keep the mitochondrial structure stable, particularly the membrane permeability transition.

Table 1 – Effects of hepatic ischemia/reperfusion on pigs, submitted or not to ischemic preconditioning on the serum levels of aspartate aminotransferase, alanine amonotransferase and bile production.

Characteristic	Control group	IR group	IPC+IR group	P
	n=6 ($\bar{X} \pm SD$)	n=6 ($\bar{X} \pm SD$)	n=6 ($\bar{X} \pm SD$)	
AST pre-ischemia (UI/L)	37.7±14.6	32.3±14.9	39.2±13.0	0.69
AST 180 min of reperfusion (UI/L)	46.2±23.7 ^(a)	702.2±118.1 ^(c)	431.3±122.0 ^(b)	<0.01
ALT pre-ischemia (UI/L)	31.3±4.4	23.7±7.9	31.3±6.9	0.10
ALT 180 min of reperfusion (UI/L)	27.0±6.9 ^(a)	57.2±17.5 ^(b)	59.2±25.4 ^(b)	0.01
Bile production (mL/180min of reperfusion)	49.3±8.4 ^(c)	5.3±3.3 ^(a)	21.2±6.9 ^(b)	<0.01

$\bar{X} \pm SD$: mean value \pm standard deviation; ANOVA followed by Tukey test; $P < 0.05$

Non-coinciding index-letters represent statistically significant differences in the post—hoc. Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion; AST: aspartate aminotransferase (UI/L); ALT: alanine aminotransferase (UI/L).

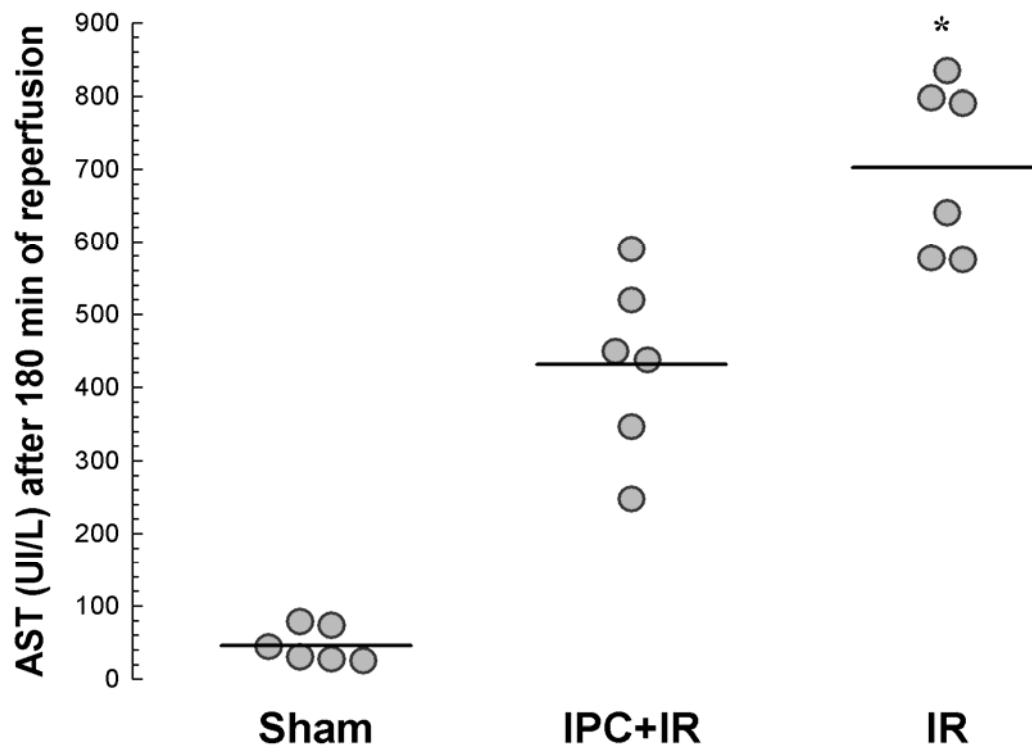


Figure 1 – Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) in a model of hepatic ischemia/reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning. *The AST levels were higher in the IR group, compared with the IPC+IR group and compared with the control group ($P < 0.01$). Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion. ANOVA followed by Tukey test; $P < 0.05$.

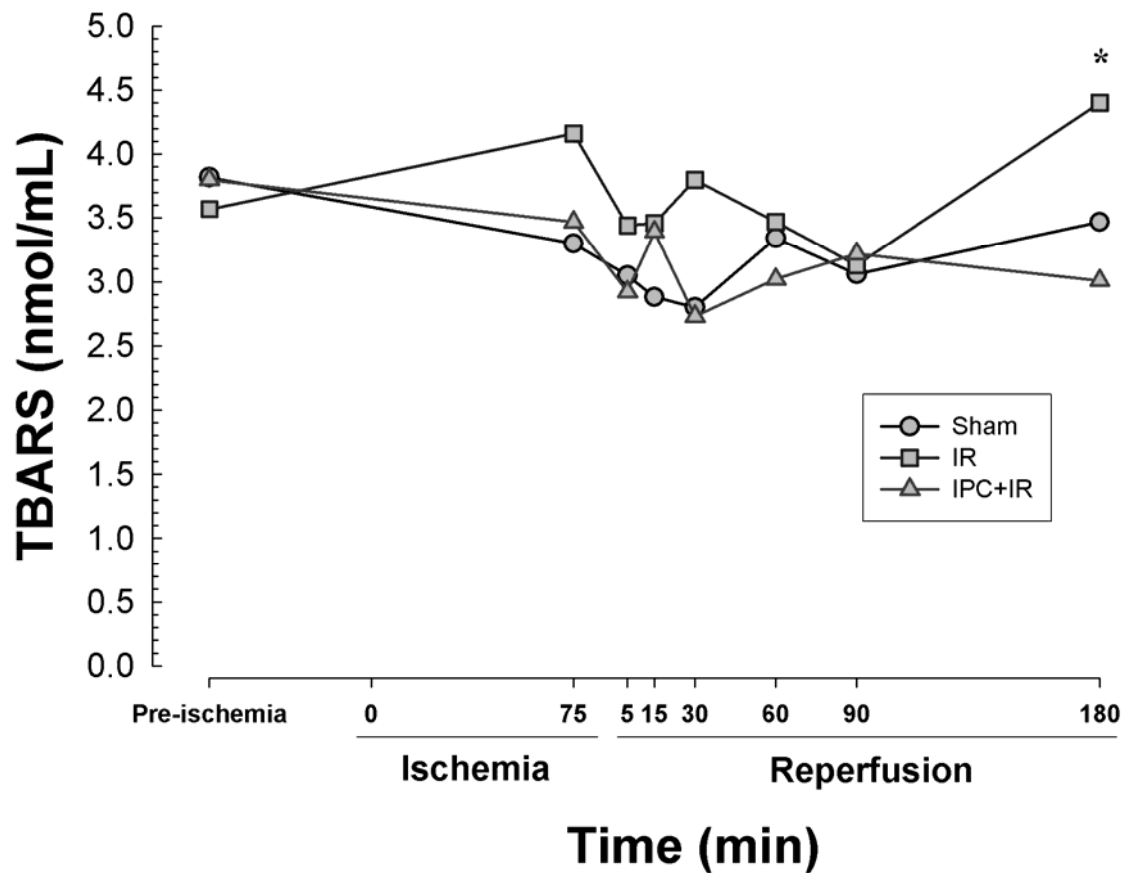


Figure 2 – Serum level (mean) of thiorbarbituric acid reactive substances (TBARS) in a model of hepatic ischemia and reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning. *The serum levels of TBARS were significantly higher in the 180 minutes of reperfusion, in the IR group versus the IPC+IR group ($P=0.05$). Control group: *sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes. IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion. Analysis of variance of repeated measures; $P<0.05$.

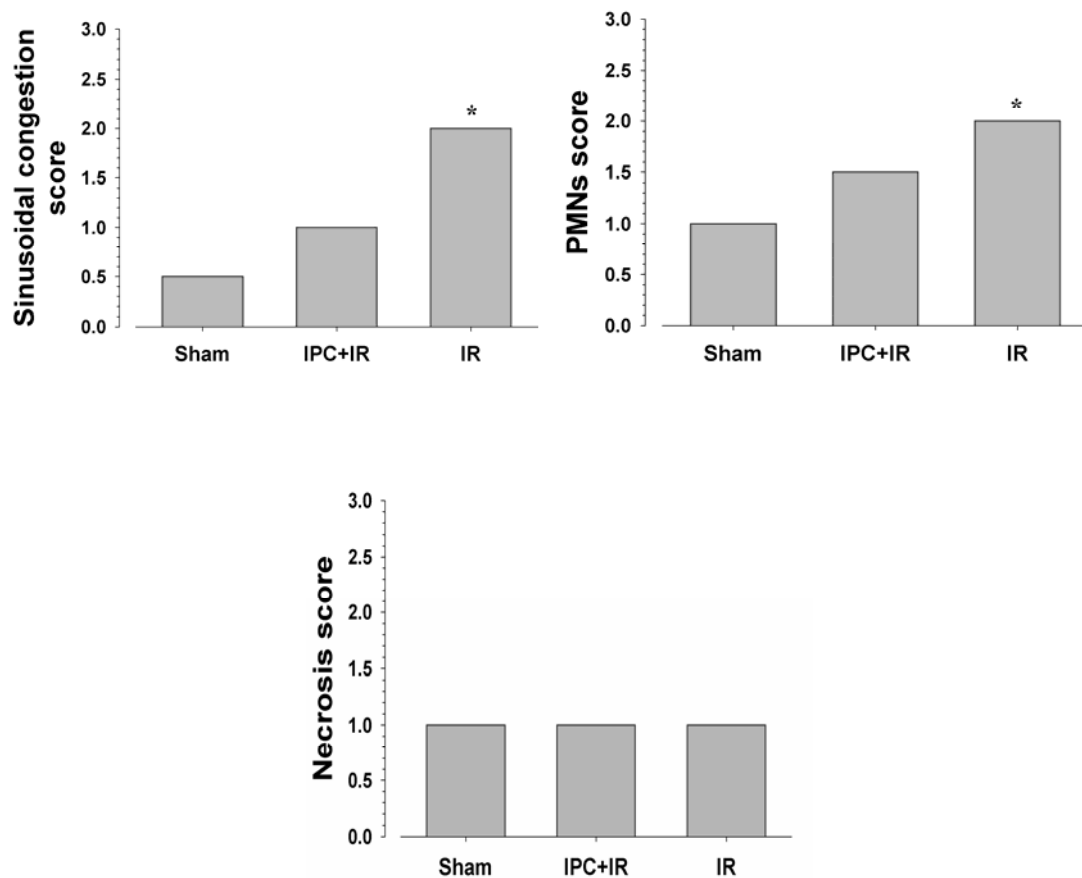


Figure 3 – Hepatic injury score (median) assessed by optical microscopy in a model of hepatic ischemia/reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning. *Sinusoidal congestion was significantly greater in the IR group versus control group ($P=0.02$). *Polymorphonuclear (PMNs) infiltration was significantly higher in the IR group versus the control group ($P=0.01$). Necrosis was not different among the three groups ($P=0.24$). Control group: *sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes. IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion. Data are presented as median. The scores were Rank transformed prior to analysis and comparisons were conducted via ANOVA followed by Tukey post hoc procedure; $P<0.05$.

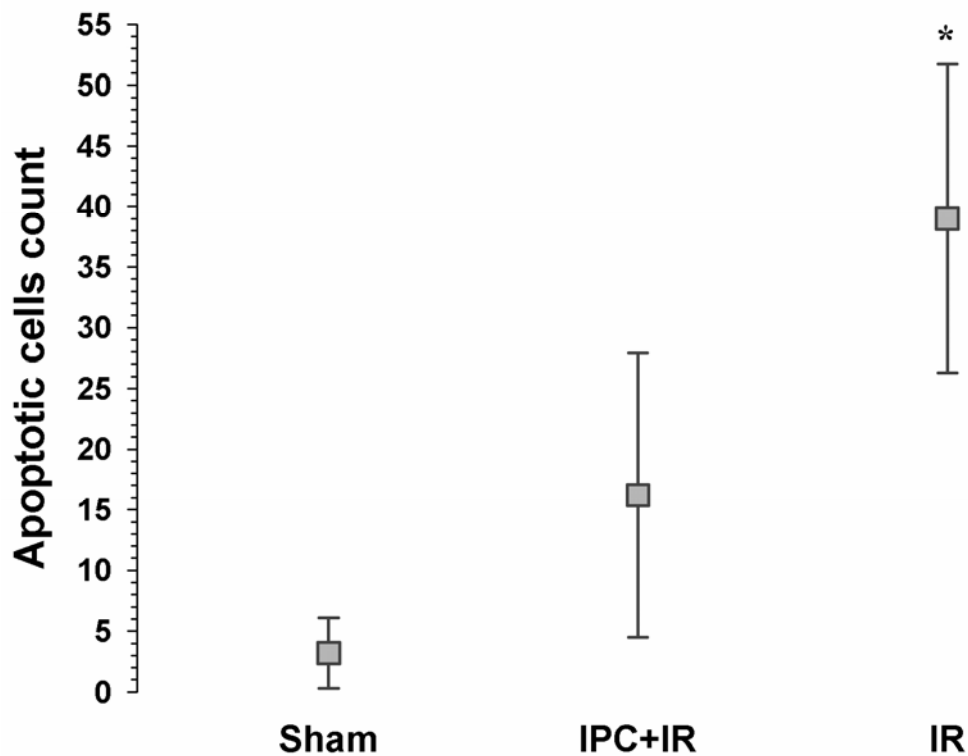


Figure 4 – Total score of apoptotic cells (hepatocytes+sinusoidal cells), assessed by the immunohistochemical technique, using the cleaved, polyclonal anticaspase-3 antibody (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, USA) under an optical microscope, in a model of hepatic ischemia/reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning. *The total score of apoptotic cells in the IR group (39.0 ± 12.7), was significantly higher than in the IPC+IR group (12.0 ± 10.1) and than the one found in the control group (3.2 ± 2.9) ($P < 0.01$). Control group: *sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion. Data are presented as mean \pm SD. ANOVA followed by the Tukey test; $P < 0.05$.

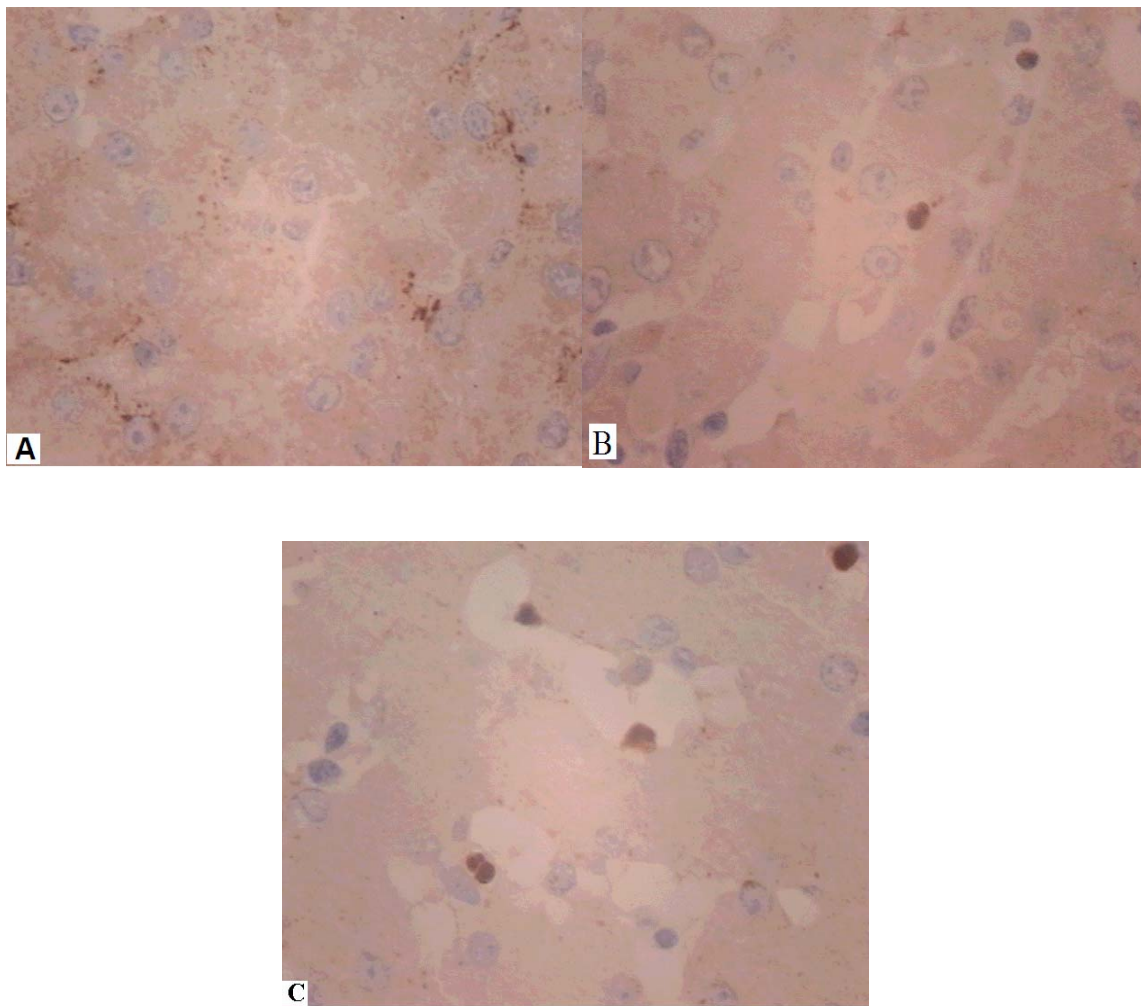
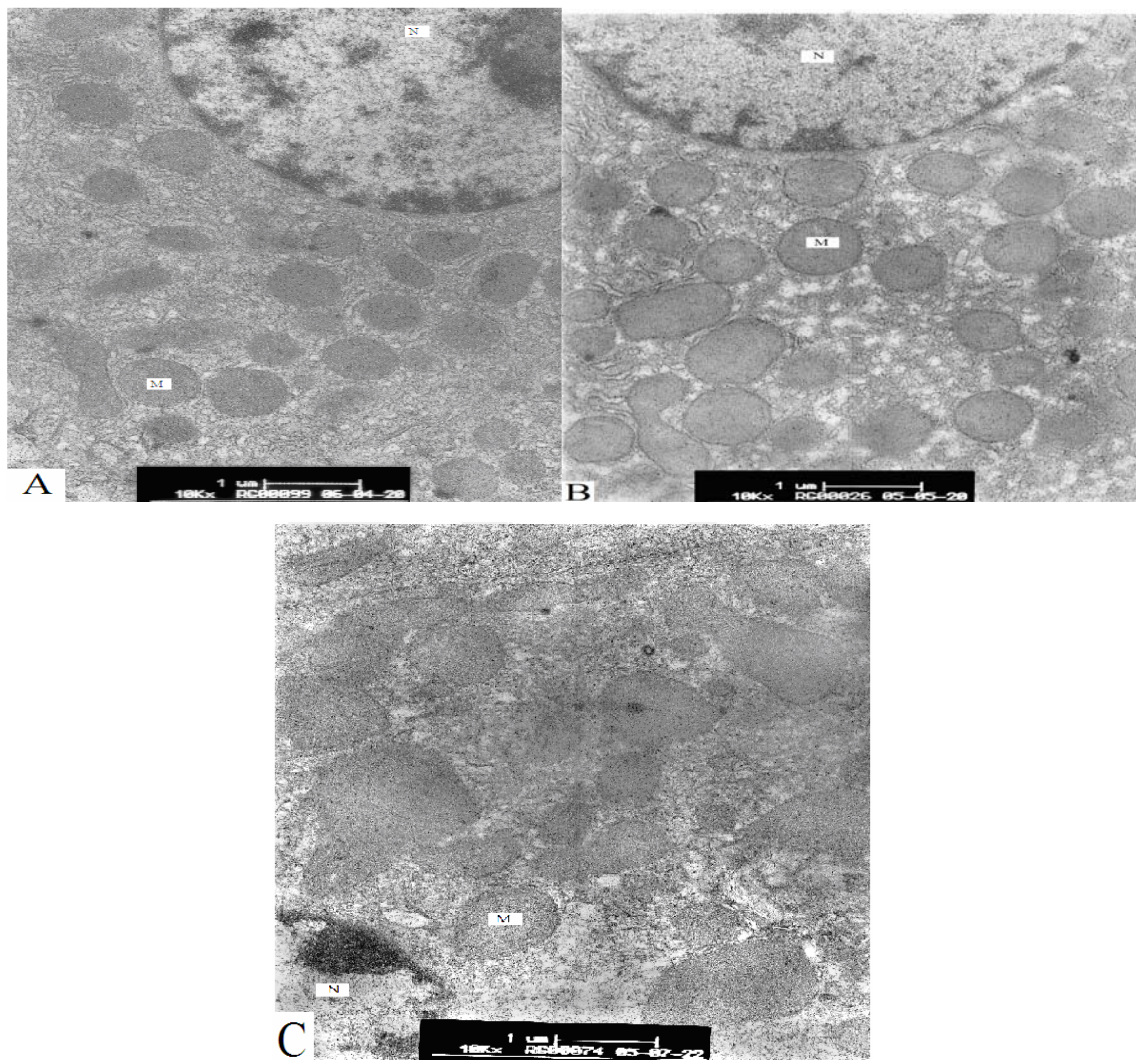


Figure 5A, B, C – Immunohistochemistry showing sample of hepatic tissue stained with the cleaved polyclonal anticaspase-3 antibody (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, USA) under an optical microscope (400x magnification) in a model of hepatic ischemia/reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning A) control group, hepatocytes and sinusoidal cells do not show caspase-3 activity; B) IPC+IR group, a few hepatocytes and apoptotic sinusoidal cells. C) IR group, several hepatocytes and apoptotic sinusoidal cells . Control group: *sham operation*; IR group: 90 minutes of ischemia followed by reperfusion for 180 minutes; IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion .



Figures 6A, B, C – Representative photos of the mitochondrial structure of samples of hepatic tissue under electron microscopy (x10000 magnification) in a model of hepatic ischemia/reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning. A) control group, normal mitochondrial structure; B) IPC+IR group, slightly swollen mitochondria, visible mitochondrial membrane, a few vacuoles; C) IR group, deformed swollen mitochondria, mitochondrial membrane not clearly visible, a few partly ruptured, difficulty in viewing the cristae and presence of large quantity of vacuoles in the cytoplasm. Control group: *sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by 180 minutes of reperfusion; IPC+IR group: 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion, before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion.. M: mitochondria; N: nucleus.

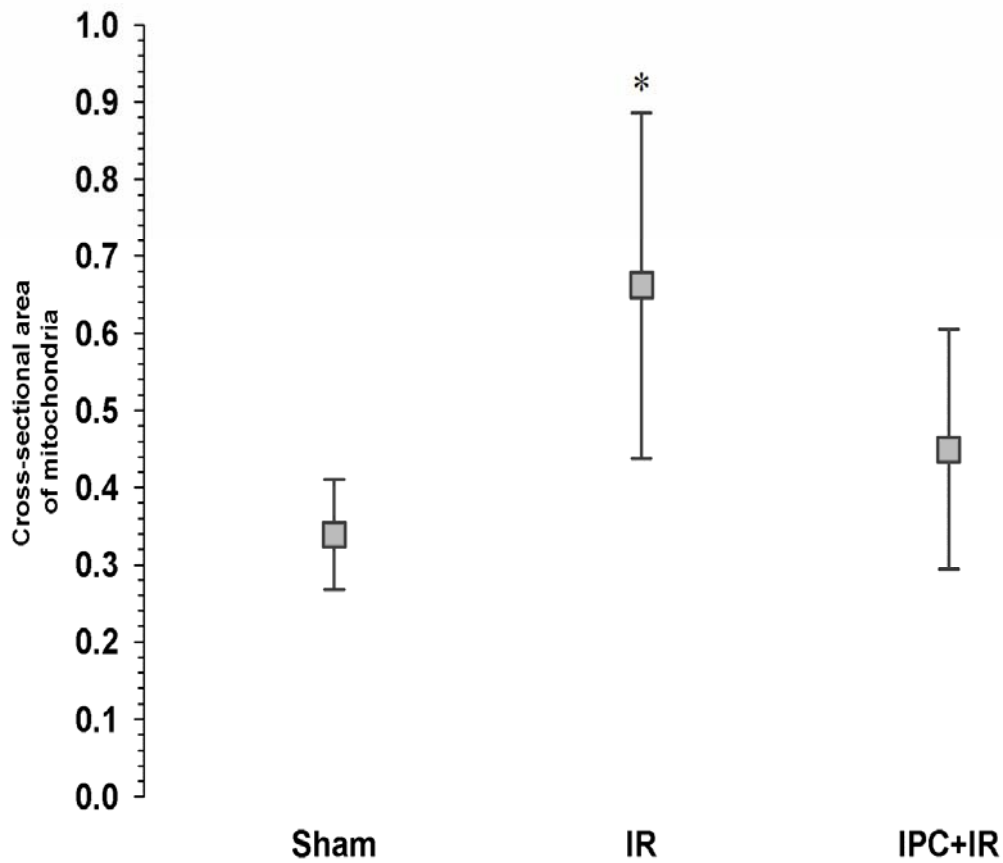


Figure 7 – Mitochondrial swelling calculated by the mean of the area of 10 mitochondria close to the nucleus, in a model of hepatic ischemia/reperfusion in pigs submitted or not to ischemic preconditioning. *The area of the mitochondria was statistically larger in the IR group ($0.6623 \pm 0.2241 \mu\text{m}$) compared with the control group ($0.3391 \pm 0.0714 \mu\text{m}$) and compared with the IPC+IR group ($0.4493 \pm 0.1456 \mu\text{m}$) ($P < 0.01$). Control group: *sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by 180 minutes of reperfusion; IPC+IR group; 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion before the 90 minutes of ischemia and 180 minutes of reperfusion. Data are presented as mean \pm SD. ANOVA followed by the Tukey test; $P < 0.05$.

REFERÊNCIAS

1. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;**20**(5): 383-396.
2. Tsai BM, Wang M, March KL, Turrentine MW, Brown JW, Meldrum DR. Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 2004;**21**(3): 195-209.
3. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;**238**(6): 843-850; discussion 851-842.
4. Adam R, Arnault I, Bao YM, Salvucci M, Sebagh M, Bismuth H. Effect of ischemic preconditioning on hepatic tolerance to cold ischemia in the rat. *Transpl Int* 1998;**11 Suppl 1**: S168-170.
5. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**(1): H198-207.
6. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;**235**(3): 400-407.
7. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P, Lemoine A, Adam R, Castaing D. 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;**202**(2): 203-211.
8. Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L, Bloch P, Aranda A, Bosch M, Huguet C. An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1980;**150**(6): 859-864.
9. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg* 2006;**19**(2): 113-123.

10. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 149-159.
11. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;**74**(5): 1124-1136.
12. Dekker LR. Toward the heart of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1998;**37**(1): 14-20.
13. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000;**86**(3): 263-275.
14. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. 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;**29**(1): 126-132.
15. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;**32**(2): 297-302.
16. 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;**16**(12): 1654-1656.
17. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;**73**(8): 1203-1211.
18. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002;**36**(1): 78-84.
19. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;**9**(1): 35-49.

20. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;**30**(5): 1223-1231.
21. Murphy A. Potential Mechanisms of Mitochondrial Cytochrome-c Release During Apoptosis. *Drug dev res* 1999:18–25.
22. Hubbard WJ, Bland KI, Chaudry IH. The role of the mitochondrion in trauma and shock. *Shock* 2004;**22**(5): 395-402.
23. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996;**184**(4): 1331-1341.
24. Kluck RM, Bossy-Wetzler E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;**275**(5303): 1132-1136.
25. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock* 2005;**24**(4): 370-375.
26. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;**183**(4): 1533-1544.
27. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;**140**(6): 1485-1495.
28. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002;**8**(11): 990-999.
29. Wills ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966;**99**(3): 667-676.
30. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;**32**: 279-312.

31. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;**105**: 121-126.
32. Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;**10**(13): 1934-1938.
33. Burra P, Chirizzi L, Cardin R, Cadrobbi R, Baldan N, Calabrese F, Pettenazzo E, Calo L, Plebani M, Rigotti P. Warm hepatic ischemia in pigs: effects of L-arginine and oligotide treatment. *J Invest Surg* 2001;**14**(6): 303-312.
34. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;**17**: 208-212.
35. Altman DG. Statistics in medical journals: developments in the 1980s. *Stat Med* 1991;**10**(12): 1897-1913.
36. van Wagensveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, Gouma DJ. Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 376-384.
37. Man K, Lo CM, Liu CL, Zhang ZW, Lee TK, Ng IO, Fan ST, Wong J. Effects of the intermittent Pringle manoeuvre on hepatic gene expression and ultrastructure in a randomized clinical study. *Br J Surg* 2003;**90**(2): 183-189.
38. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 369-375.
39. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987;**42**(5): 565-569.
40. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;**4**(5): 749-758.
41. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002;**74**(7): 905-912.

42. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;**85**(12): 1636-1640.
43. Halliwell BG, J.M Free Radic. Biol. Med. In: *Free Radicals in Biology and Medicine 3 ed* Claredon (ed): Claredon, Oxford. , 1999; 105 – 150.
44. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 127-140.
45. Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic Biol Med* 1994;**16**(6): 763-770.
46. Jaeschke H, Kleinwaechter C, Wendel A. The role of acrolein in allyl alcohol-induced lipid peroxidation and liver cell damage in mice. *Biochem Pharmacol* 1987;**36**(1): 51-57.
47. Jaeschke H, Kleinwaechter C, Wendel A. NADH-dependent reductive stress and ferritin-bound iron in allyl alcohol-induced lipid peroxidation in vivo: the protective effect of vitamin E. *Chem Biol Interact* 1992;**81**(1-2): 57-68.
48. 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;**145**(6): 1421-1431.
49. Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;**56**(1): 24-31.
50. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000;**25**(7): 319-324.
51. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 1999;**46**(2): 223-237.
52. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(6): 1652-1660.

53. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *Faseb J* 1999;**13**(2): 253-261.
54. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;**67**(8): 1099-1105.
55. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;**281**(5381): 1312-1316.
56. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 1998;**281**(5381): 1355-1357.
57. Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien PA. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 1999;**68**(1): 136-140.
58. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997;**183**(4): 477-485.
59. Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S. Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;**281**(4): G1115-1123.
60. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;**33**(2): 397-405.
61. Kimura H, Katsuramaki T, Isobe M, Nagayama M, Meguro M, Kukita K, Nui A, Hirata K. Role of inducible nitric oxide synthase in pig liver transplantation. *J Surg Res* 2003;**111**(1): 28-37.

62. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;**276**(1 Pt 1): G1-6.
63. Helling TS, Edwards CA, Helling TS, Jr., Chang CC, Hodges MC, Dhar A, VanWay C. Hepatic apoptotic activity following transient normothermic inflow occlusion and reperfusion in the swine model. *J Surg Res* 1999;**86**(1): 70-78.
64. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, Matsuno T, Nui A, Hirata K. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 2002;**73**(9): 1439-1446.

8. ARTIGO CIENTÍFICO 2

8.2. Versão em português

**PRECONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO PELA INFUSÃO
INTRAPORTAL DA L-ARGININA PROTEGE A LESÃO DE ISQUEMIA E
REPERFUSÃO HEPÁTICA PELA MANUTENÇÃO DA ULTRA-ESTRUTURA
MITOCONDRIAL E INIBIÇÃO DA APOPTOSE ATRAVÉS DA VIA DA
CASPASE 3**

Rafael Omar Giovanardi, MD¹

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD²

Carlos Thadeu Cerski, MD, PhD³

Miriam Salvador, PhD⁴

Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

¹ Professor do Departamento de clínica cirúrgica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

² Professor do curso de pós graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

³ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Professora do Departamento de Bioquímica da da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.

⁴ Professor do Departamento de Patologia, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Correspondência e solicitação de cópias: Rafael Omar Giovanardi, Departamento de clínica cirúrgica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil. Rua vinte de Setembro, 1695, Caxias do Sul, RS, Brasil. CEP 95020-450. Fone/Fax: 55 54 3223 1257.

Palavras chave: lesão hepática, isquemia e reperfusão, óxido nítrico, L-arginina, apoptose.

Título resumido: L-arginina intraportal protege o fígado da lesão de isquemia e reperfusão.

RESUMO

OBJETIVO: O envolvimento da via do óxido nítrico (NO) no fenômeno isquêmico-reperfusional é complexo, e ainda não está completamente esclarecido; bem como os efeitos da infusão intraportal da L-arginina (substrato para a síntese do NO), na fase precoce da lesão de isquemia e reperfusão em fígado de suínos. Este estudo avaliou os efeitos benéficos ou deletérios, da infusão intraportal da L-arginina, na fase precoce da reperfusão em fígado de suínos; observando mudanças na morfologia das células hepáticas, apoptose/necrose e alterações na ultra-estrutura mitocondrial.

METODOS: Estabeleceu-se um modelo experimental de 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão, em suínos, mediante *bypass* venovenoso passivo. Dezoito suínos híbridos (fêmeas) foram randomizados em grupo-controle (*sham* grupo), grupo não condicionado (isquemia e reperfusão) e grupo submetido a um condicionamento farmacológico (infusão intraportal *in bolus* de L-arginina, 400 mg/kg) antes da isquemia e reperfusão. Concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade sérica dos antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram medidos. A produção de bile durante a reperfusão foi medida. Amostras do tecido hepático foram retiradas aos 180 minutos da reperfusão para análise histológica e de microscopia eletrônica. As células apoptóticas foram determinadas pela técnica imunistoquímica com anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada. A ultra-estrutura mitocondrial foi observada por meio da microscopia eletrônica.

RESULTADOS: O condicionamento farmacológico com L-arginina aumentou a produção de bile ($P<0,01$) e atenuou a elevação sérica da AST ($P<0,01$) quando comparado com o grupo não condicionado. A concentração sérica do TBARS não foi significativamente diferente nos três grupos; a atividade da SOD foi significativamente maior nos 60 minutos ($P=0,04$) da reperfusão no grupo condicionado. A congestão sinusoidal ($P=0,02$) foi mais evidente no grupo não condicionado quando comparado com o grupo-controle. A infiltração de polimorfonucleares ($P=0,01$), nos sinusóides, foi mais evidente no grupo não condicionado quando comparado com os grupos condicionado e controle. A atividade da caspase 3 demonstrou a apoptose como forma predominante de

morte celular na fase precoce da reperfusão. O grupo submetido ao condicionamento farmacológico com L-arginina apresentou 2,5 vezes menos atividade da caspase 3 quando comparada com o grupo não condicionado ($P<0,01$). A lesão mitocondrial foi atenuada no grupo condicionado ($P<0,01$).

CONCLUSÃO: Neste estudo, demonstramos que a apoptose foi a forma predominante de morte das células hepáticas na fase precoce da reperfusão. O condicionamento farmacológico, com a infusão intraportal de L-arginina, inibiu a apoptose das células hepáticas, e foi associado a uma melhor preservação da ultra-estrutura mitocondrial e inibição da atividade da caspase 3.

INTRODUÇÃO

A lesão hepática de isquemia e reperfusão é uma importante causa de disfunção do fígado e ocorre após várias formas de choque, cirurgia hepática para trauma ou câncer e no transplante de fígado.¹⁻⁴ Os mecanismos associados à lesão de isquemia e reperfusão ainda não estão totalmente esclarecidos, porém, esse processo parece ser decorrente de uma resposta inflamatória aguda e de uma disfunção microvascular, que levam, em última análise, à lesão celular irreversível. Um grande número de mediadores tem sido implicado na patogênese da lesão vascular, que ocorre na isquemia e reperfusão, entre estes o óxido nítrico (NO), que parece ter diferentes funções fisiológicas no organismo.^{5, 6}

O NO protege o fígado pela melhora da microcirculação, através de um efeito vasodilatador, efeito antiplaquetário, pela inibição da ativação dos neutrófilos, neutralização dos radicais livres tóxicos, bem como exercendo efeito antiapoptótico.⁶ A manipulação da bioatividade do NO, devido à sua inibição ou ao aumento, em modelos experimentais, demonstra seu papel nas lesões de isquemia e reperfusão hepática.^{4, 7, 8} Enquanto a administração de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) - enzima responsável pela síntese do NO -, aumenta a lesão em modelos animais de isquemia e reperfusão,^{8, 9} a administração de doadores do NO, ou a suplementação com precursores do NO (tais como a L-arginina), minimiza a lesão hepática de isquemia e reperfusão melhorando a microcirculação.^{4, 7, 9-14} Esses estudos suportam o conceito de que existe uma deficiência na biodisponibilidade hepática do NO na fase precoce da reperfusão.

Por outro lado, contrastando com a atividade citoprotetora, o NO pode ser também citotóxico, uma vez que reage com espécies ativas de oxigênio (superóxido), formando peroxinitrito.^{15, 16} Esses eventos podem culminar na peroxidação lipídica, morte celular e lesão hepática.^{16, 17} A determinação do NO, como um citoprotetor e não como um agente citotóxico, em algumas circunstâncias clínicas, pode ser verificada pela ocorrência de apoptose, que é

um importante processo no desenvolvimento da lesão de isquemia e reperfusão hepática.¹⁸⁻²⁰

Nesse contexto, estudos demonstram que o NO pode ter efeito pró-apoptótico ou antiapoptótico,^{21, 22} ou seja, o NO e/ou seus bioprodutos podem promover apoptose, mediante múltiplos potenciais mecanismos, incluindo a indução da liberação de citocromo c, pela ativação da transição da permeabilidade mitocondrial, de lesão direta sobre o DNA, ou mesmo por meio de vias que ativem as caspases.²² Por outro lado, recentes estudos também sugerem que o NO, mesmo em altos níveis, pode ter papel protetor contra a lesão do parênquima hepático, envolvendo vias antiapoptóticas associadas com as caspases 3, 8 e 9.²³⁻²⁵

O efeito da via da L-arginina/NO na lesão hepática de isquemia e reperfusão, além de complexo, é ainda controverso, podendo estar associado a ambos, efeitos citoprotetor ou citotóxico.²⁶ Além disso, a maioria dos estudos experimentais para avaliar as lesões hepáticas de isquemia e reperfusão quente reportam à infusão intravenosa periférica ou peritoneal de L-arginina, como forma de manutenção dos níveis do NO na reperfusão. Nosso estudo, portanto, foi realizado para examinar os efeitos benéficos ou deletérios da infusão intraportal da L-arginina (considerada um substrato para a síntese de NO), na fase precoce da lesão de isquemia e reperfusão quente em fígado de suínos, particularmente observando alterações na morfologia das células hepáticas, presença de apoptose/necrose e modificações na ultra-estrutura mitocondrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e técnica cirúrgica

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Universidade de Caxias do Sul e foi realizado de acordo com as normas aprovadas para estudo com animais. Dezoito suínos (fêmeas) híbridos, pesando entre 18 e 23 kg foram usados. Após refeição noturna, os animais foram sedados com Cloridrato de Ketamina (Cristália, Brasil) (2mg/kg intramuscular) e sulfato de atropina (Cristália, Brasil) (0,025 mg/kg intramuscular) e anestesiados com thiopental sódico (Cristália, Brasil) (0,5 mg/kg intravenoso). Os animais foram intubados e conectados a um respirador automático (Takaoka model KT-13, série Sansei plus, Brasil), e mantidos sob anestesia geral com uma mistura de oxigênio e isoflurano (Isoforine - Cristália, Brasil). Por meio de uma incisão cervical, a artéria carótida e ambas veias jugulares foram isoladas. A artéria foi cateterizada com um cateter de polietileno para medida da pressão arterial média. As veias jugulares foram cateterizadas para reposição volêmica, usando solução salina isotônica, e para a medida da pressão venosa central. A temperatura corporal foi monitorada pela introdução de um termômetro por um orifício puntiforme na região axilar e mantida acima de 37°C por meio de campos cirúrgicos aquecidos. O traçado eletrocardiográfico e a oximetria foram continuamente monitorados durante todo o procedimento. Por meio de uma incisão mediana, o fígado foi esqueletizado, e foram seccionados os ligamentos suspensores. A veia porta, a artéria hepática e o ducto biliar comum foram isolados. A isquemia hepática foi induzida pela oclusão da veia porta, da artéria hepática sem ocluir o ducto biliar. Para evitar congestão esplâncnica, realizou-se uma circulação venovenosa extracorpórea passiva. Para isto, utilizou-se um *bypass* venovenoso entre a veia esplênica e a veia jugular interna esquerda, com um tubo siliconado. Realizou-se heparinização sistêmica com 2,000 unidades de heparina 5 minutos antes da isquemia. O ducto biliar comum foi cateterizado proximalmente para determinar a produção de bile durante o período de isquemia e reperfusão; o ducto cístico foi ocluído. A isquemia hepática foi mantida por 90 minutos, e a reperfusão foi

realizada posteriormente por 180 minutos. A congestão esplâncnica não foi macroscopicamente observada durante o período de isquemia. Não foi necessário o uso de vasopressores. Os animais foram sacrificados 3 horas após a reperfusão.

Coletas sangüíneas (5 ml) foram realizadas e armazenadas em tubos heparinizados no começo da laparotomia; antes da reperfusão (aos 75 minutos de isquemia); nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos da reperfusão. Determinaram-se as concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Realizou-se biópsia hepática aos 180 minutos da reperfusão, para determinar alterações histológicas e à microscopia eletrônica.

Modelo do experimento

Os animais foram randomizados em três grupos, com seis animais em cada. Grupo-controle (*Sham-operated*): o fígado foi exposto por 5 horas, não houve isquemia hepática (os animais foram submetidos à anestesia, laparotomia e dissecação das estruturas do hilo hepático); grupo não condicionado (grupo IR): animais foram submetidos a 90 minutos de isquemia hepática e, posteriormente, a 180 minutos de reperfusão; grupo condicionado farmacologicamente (grupo L-a+IR): 10 minutos antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão, o fígado foi submetido ao protocolo de condicionamento farmacológico, ou seja, infusão intraportal *in bolus* de L-arginina 400 mg/kg (Sigma Química, Brasil).

Análise das enzimas hepáticas

Realizou-se coleta de sangue no início do procedimento e no final do período de reperfusão. O sangue foi centrifugado e o plasma separado. A lesão hepática irreversível foi avaliada pela determinação das concentrações séricas da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As

determinações séricas da AST e ALT foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico, por meio de sistema automatizado SELECTRA II Merck,[®] utilizando *kit* comercial da Labtest (Labtest Diagnóstica SA, Brasil). Os resultados foram expressados em UI/L.

Determinação da produção de bile

A produção de bile, como parâmetro de função excretora do fígado, foi monitorada durante todo o período da reperfusão e expressa como mililitros/3 horas de reperfusão.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica tem sido usada como uma medida indireta da lesão oxidativa induzida pelos radicais livres de oxigênio. A determinação dos níveis de estresse oxidativo foi realizada medindo-se os produtos de reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo método descrito por Wills, 1966.²⁷ O resultado foi descrito em nmol/mL. Amostras de sangue foram coletadas antes da isquemia; antes da reperfusão (aos 75 minutos de isquemia); nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos da reperfusão. Essa análise permite estudar a peroxidação lipídica mediante a quantificação dos aldeídos formados pela degradação dos hidroperóxidos.

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi medida espectrofotometricamente em amostras de sangue coletado. O método baseia-se na inibição pela SOD da formação de adenocromo, decorrente da auto-oxidação da epinefrina. Baseando-se nesse fenômeno, a SOD pode ser medida espectrofotometricamente seguindo a diminuição de absorvância da epinefrina a 480 nm em uma reação contendo 1mmol/L epinefrina (pH 2.0) and 50 mmol/L glycina (pH 10.2),²⁸ ambas da E- Merck[®]. Essa reação foi conduzida em uma temperatura constante de 30°C durante 3 minutos. Os resultados foram descritos como unidades de

superóxido dismutase por grama de proteína (U/g de proteína). Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de formação do adenocromo em 50%.

Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

O método de medida para a atividade da catalase (CAT) foi realizado de acordo com o descrito por Aebi.²⁹ O princípio do método é baseado na determinação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (E- Merck®), medido espectrofotometricamente a 240 nm. Essa reação foi conduzida em uma temperatura constante de 30°C durante um minuto. Os resultados foram descritos como unidades de catalase por mg de proteína (U/mg de proteína). Uma unidade de catalase decompõe 1 μmole of H₂O₂ por min a um pH 7.4 e 30°C.

Proteínas

O nível total de proteínas foi analisado pelo método Biureto (Kit Proteínas Totais/Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), pela determinação espectrofotométrica a 545nm.

Avaliação histológica e imunoistoquímica

As amostras de tecido hepático foram retiradas de cada um dos seis animais de cada grupo aos 180 minutos da reperfusão, para análise histológica, pela coloração com haematoxilina and eosina (H&E) e, imunoistoquímica, pelo anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) ao microscópio óptico (Olympus BX 41, Japan). Um patologista, experiente em patologia hepática, examinou as lâminas sem ter conhecimento dos grupos.

Haematoxylina and Eosina (H&E): As biópsias foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em blocos de parafina. As secções, após coradas com haematoxilina and eosina (H&E), foram examinadas ao microscópio óptico para

a verificação morfológica da ocorrência de congestão sinusoidal, vacuolização do citoplasma, infiltração de polimorfonucleares (PMNs), esteatose e necrose. Os critérios morfológicos para necrose foram previamente descritos: aumento da eosinofilia, rompimento celular, perda da arquitetura e *karyolysis*.³⁰

A quantificação da congestão sinusoidal, vacuolização do citoplasma, infiltração de polimorfonucleares (PMNs), esteatose e necrose foi determinada semiquantitativamente: congestão sinusoidal (escore 0 – 3): ausente = 0; leve (dilatação da veia centro-lobular) = 1; moderada (dilatação da veia centro-lobular + dilatação sinusoidal da zona 3) = 2; severa (dilatação da veia centro-lobular + dilatação sinusoidal da zona 3 e zona 2) = 3; vacuolização do citoplasma (escore 0 – 3): ausente = 0; leve (raros hepatócitos perivenulares) = 1; moderada (numerosos hepatócitos perivenulares) = 2; severa (alterações dos hepatócitos além da zona 3) = 3; PMNs (escore 0 - 4) ausente = 0; raras células = 1; focal = 2; multifocal = 3; difusa e uniformemente intensa = 4; necrose (escore 0 – 4): ausência necrose = 0; focos de necrose (alguns hepatócitos necróticos na zona 3) = 1; necrose focal (periportal ou perivenular ou no meio do ácino) = 2; necrose multifocal (necrose em mais do que uma zona acinar) = 3; necrose lobular (necrose-ponte entre as estruturas vasculares portais e centro-lobular – difusa, zonas 1, 2, 3) = 4; e esteatose (escore 0 – 3) <5% = 0; leve (33%) = 1; moderada (33% - 66%) = 2; severa (>66%) = 3.

Caspase 3: Imunoistoquímica para caspase 3 clivada foi realizada em tecido fixado em formalina e incluído em parafina de amostras de fígados de suínos retiradas de cada grupo aos 180 minutos de reperfusão. Para a preparação imunoistoquímica, cortes de quatro micrômetros dispostos em lâminas silanizadas foram desparafinizados em xileno, hidratados em álcool e pré-tratados para recuperação antigênica em ácido cítrico (pH 6,0) utilizando-se steamer à temperatura de 98°C por 20 minutos. As lâminas foram incubadas, empregando-se anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) na diluição de 1:300, anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho na diluição de 1:320 (BA-1000, *Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA), sistema de detecção VECTASTAIN Elite ABC kit (PK-6100, *Vector*

Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e cromógeno diaminobenzidina-DAB (D5637, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). Controles positivo (tecido linfóide) e negativo atestam a fidelidade da reação.

A análise morfométrica das células coradas pela técnica imunoistoquímica foi realizada com microscopia óptica, utilizando-se uma ampliação (magnificação de 400x) (Olympus BX 41, Japan). Para avaliação da atividade da caspase 3, efetuou-se uma análise semiquantitativa das células que evidenciaram marcação pelo anticorpo aplicado. O número de células positivas para a reação imunoistoquímica foi determinado pela contagem do número de núcleos positivos presentes em 20 campos randomizados em cada lâmina. A avaliação abrangeu a contagem de 10 espaços porta (um espaço porta por campo, tendo como referência central o espaço porta, priorizando região de septos para aumentar o número de células contadas) e 10 veias centro-lobulares (uma veia centro-lobular por campo, tendo como referência central a veia centro-lobular terminal), o que representou uma área total de 360 mm² (18 mm²/campo). O número de hepatócitos e de células sinusoidais (SLCs) apoptóticas foram contadas independentemente e definidas pela média, como o número total de células da respectiva população avaliada. As células apoptóticas consideradas apresentaram características previamente descritas.³¹ As células que demonstraram coloração marrom do citoplasma e as células positivas livres no interior dos sinusóides (linfócitos e PMNs) não foram consideradas positivas para o marcador de caspase 3. A presença de áreas de marcada infiltração linfocítica ou necrose foram afastadas para contar células apoptóticas, como previamente descrito.³²

Microscopia eletrônica

As amostras de tecido hepático foram retiradas de cada um dos seis animais, de cada grupo, aos 180 minutos da reperfusão, para avaliação mediante microscopia eletrônica. A avaliação pela microscopia eletrônica foi feita por dois observadores cegos para os grupos estudados.

O material, após biópsia (um mm³), foi imediatamente colocado em solução fixadora com Glutaraldeído 2%. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% tamponado, seguido então por uma etapa de contrastação in bloc com acetato de uranila 1%. A desidratação processou-se em série alcoólica gradativa. A pré-embrição do material foi feita em uma mistura de epon 812 com acetona pura nas seguintes proporções: 75%, 50%, 25%. A embebição foi feita com epon 812 puro durante 24 horas. A polimerização efetuou-se em estufa a 60°C constantes por 72 horas. Os cortes semifinos foram feitos no ultramicrotomo, Leica Ultracut UCT 2.0, sendo utilizada navalha de diamante, Drukker type histo with trough 8 mm, com uma espessura de 800 nm e corados com solução aquosa de azul de toluidina 1% + fucsina básica. Os cortes ultrafinos foram feitos com uma espessura de 70 nm no mesmo ultramicrotomo, com uma navalha de diamante, (*Drukker type histo with trough 3 mm*). Para a contrastação dos cortes ultrafinos, utilizou-se solução de uranila metanílica e após citrato de chumbo.³³ O microscópio eletrônico utilizado para a observação dos cortes ultrafinos foi o EM208S Philips (*Philips Electronic Instruments Inc, Eindhoven, Holland*), com a voltagem de aceleração de 80-kV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/RS).

Alterações das mitocôndrias: As modificações ultra-estruturais das mitocôndrias foram avaliadas para determinar a presença de edema mitocondrial e alterações na membrana mitocondrial. O edema mitocondrial foi avaliado semiquantitativamente pela média da medida das áreas de 10 mitocôndrias próximas ao núcleo de cada animal usando o *software* Carnoy v. 2.0 (<http://www.carnoy.org>) para a medida da área da elipse: $A = \pi ab$; onde (a) representa o semidiâmetro maior e (b) o semidiâmetro menor. Os resultados foram expressos em μm .

Análise estatística

Considerando que havia interesse em testar diferenças com magnitudes de efeito iguais ou maiores do que duas unidades de desvio padrão ($E/S \geq 2$), estimou-se que, com seis (6) animais por grupo, obter-se-ia um poder estatístico

de aproximadamente 90% em um nível de significância $\alpha=0,05$. Os dados foram descritos por média e desvio padrão e, em escores de escala de pouca amplitude, optou-se pela mediana, e os valores mínimo e máximo. A evolução dos valores de TBARS, SOD e CAT foi avaliada por modelo de análise de variância de medidas repetidas. As outras comparações envolvendo momentos específicos foram avaliadas por oneway-ANOVA com localização de diferenças por teste de Tukey. Os escores foram ordenados em postos (*Rank*) e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$, sendo os dados analisados com o programa SPSS versão 12.0 e *SigmaPlot* versão 8.0.³⁴

RESULTADOS

Análise das enzimas hepáticas

As modificações séricas das aminotransferases, 180 minutos após a reperfusão, estão resumidas na tabela 1. Os níveis séricos da AST e ALT no grupo-controle não sofreram alteração significativa durante o procedimento. No grupo não condicionado, as concentrações séricas da AST e ALT aumentaram aproximadamente 15 e 2 vezes, respectivamente, em relação ao grupo-controle. Essas alterações foram significativamente diminuídas pelo condicionamento farmacológico (Figura 1).

Função excretora do fígado (produção de bile)

Após 180 minutos de reperfusão, a produção de bile foi quase completamente parada no grupo não condicionado, ($5,3 \pm 3,3$ ml); por outro lado, a produção de bile no grupo condicionado com L-arginina ($28,0 \pm 5,6$ ml) atingiu aproximadamente 60% do volume produzido pelo grupo-controle ($49,3 \pm 8,4$ ml) ($P < 0,01$) (Tabela 1).

Níveis séricos do TBARS e atividade sérica das enzimas antioxidantes CAT e SOD

Os níveis séricos do TBARS obtidos foram maiores no grupo não condicionado em relação aos outros dois grupos em praticamente todas as amostras coletadas; porém, os valores não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos (Figura 2).

A atividade da CAT não foi diferente entre os três grupos em nenhuma das amostras. A atividade da SOD foi significativamente maior no grupo condicionado ($4,70 \pm 1,84$), quando comparada com o grupo-controle ($1,88 \pm 1,57$) 60 minutos após a reperfusão ($P = 0,04$).

Alterações histológicas

A avaliação das amostras hepáticas pela microscopia óptica, obtida no final dos 180 minutos de reperfusão, demonstrou apenas alterações de menor magnitude nos três grupos. A esteatose foi menor que 5% em todos os grupos ($P=0,39$), a vacuolização do citoplasma esteve presente em raros hepatócitos perivenulares ($P=0,24$), e a necrose hepática foi de pequena monta igualmente nos três grupos ($P=0,32$). A congestão sinusoidal foi mais evidente no grupo não-precondicionado que no grupo condicionado e no grupo-controle, embora a diferença tenha sido significativa apenas em relação ao grupo controle ($P=0,02$). A infiltração dos polimorfonucleares (PMNs), observada nos sinusóides, foi estatisticamente maior no grupo não condicionado em relação aos outros dois grupos ($P=0,01$) (Figure 3).

Atividade da caspase 3

Mediante microscopia óptica e observação da atividade da caspase 3, observou-se que a morte celular, na fase precoce da reperfusão, ocorreu primariamente pela apoptose. As células apoptóticas ocorreram na mesma proporção entre as zonas centro-lobular e portal em cada grupo ($p>0,05$). O escore de células sinusoidais apoptóticas foi maior que o escore dos hepatócitos apoptóticos, tanto na zona centro-lobular quanto na zona portal nos dois grupos submetidos à isquemia e reperfusão ($P<0,05$). O escore total de células apoptóticas (zona centrolobular + zona portal), no grupo não condicionado ($39,0\pm 12,7$), foi significativamente maior que o encontrado no grupo condicionado ($16,2\pm 11,7$) e que o encontrado no grupo-controle ($3,2\pm 2,9$) ($P<0,01$) (Figura 4).

O grupo não condicionado demonstrou aproximadamente 2,5 vezes mais atividade da caspase 3, quando comparado com o grupo condicionado ($P<0,01$); por outro lado, a atividade da caspase 3, encontrada no grupo condicionado, foi maior que no grupo-controle; entretanto, o escore encontrado não foi estatisticamente diferente (Figuras 5A, B, C).

Modificações ultra-estruturais das mitocôndrias

No grupo-controle a ultra-estrutura mitocondrial foi normal, disposta organizadamente na forma cilíndrica ou elíptica sem edema. A membrana mitocondrial apresentou-se intacta e bem visualizada. Em ambos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão, edema mitocondrial, bem como alteração na membrana das mitocôndrias foi observado; porém, essas alterações foram significativamente menos intensas no grupo condicionado em relação ao grupo não condicionado (Figuras 6A, B, C). A área das mitocôndrias foi estatisticamente maior no grupo não condicionado ($0,6623 \pm 0,2241 \mu\text{m}$) em relação ao grupo-controle ($0,3391 \pm 0,0714 \mu\text{m}$) e em relação ao grupo condicionado com L-arginina ($0,4077 \pm 0,0416 \mu\text{m}$), ($P < 0,01$) (Figura 7).

DISCUSSÃO

Nesse modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática normotérmica em suínos, a infusão intraportal de L-arginina resultou em aumento da resistência das células hepáticas as lesões de isquemia e reperfusão. Observou-se, uma melhora da função hepatocelular e uma melhor preservação da integridade das células hepáticas como resultado do efeito protetor da L-arginina intraportal. Os mecanismos protetores da L-arginina exógena resultaram em menor concentração sérica da AST, aumento da produção de bile e resultaram em uma redução significativa da apoptose das células sinusoidais e dos hepatócitos. A atividade da caspase 3, claramente evidente após a reperfusão foi reduzida pela infusão exógena de L-arginina intraportal, bem como foram reduzidas as alterações na ultra-estrutura mitocondrial.

Um grande número de agentes farmacológicos tem sido utilizado para atenuar as lesões de isquemia e reperfusão no fígado. Esses agentes podem tanto bloquear as vias de lesão diretamente ou eles submetem o fígado a um condicionamento farmacológico, ou seja, induzem um baixo nível de estresse nas células hepáticas, e estas, por sua vez, iniciam um mecanismo de defesa celular contra um posterior insulto mais agressivo.³⁵ Dentre essas substâncias, podem ser relacionados antioxidantes, inibidores das proteases e moléculas antiapoptóticas, agonistas da adenosina, doadores de NO ou precursores do NO (tais como a L-arginina), entre outros.^{26, 35}

As primeiras horas da reperfusão são inquestionavelmente caracterizadas por baixas concentrações de NO,^{6, 7, 12} e modelos experimentais têm demonstrado que a manutenção dos níveis de NO, durante a reperfusão, pela administração de L-arginina, atenua as lesões de isquemia e reperfusão hepática; não obstante, a grande maioria desses estudos utilizou a infusão intravenosa periférica ou peritoneal dessa substância.^{4, 6-14, 36}

Os efeitos hepatoprotetores da L-arginina, mediante a infusão intraportal, foram claramente demonstrados neste estudo; no entanto, sem repercutir no estado hemodinâmico dos animais. A redução significativa dos níveis séricos da AST aos 180 minutos da reperfusão refletem o efeito benéfico desse condicionamento farmacológico nesse modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática *in vivo*, o que também foi verificado por outros autores.^{6, 8, 12, 36, 37} Os níveis séricos da AST foram significativamente elevados em ambos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão; em contraste, as concentrações séricas de ALT, além de apresentarem níveis séricos bem-inferiores, foram significativamente elevadas no grupo não condicionado em relação ao grupo-controle; porém, não foram diferentes em relação ao grupo condicionado. Alguns autores têm descrito que o tempo necessário para a liberação da ALT, na circulação sangüínea, é maior que o da AST, o que justifica estes dados.^{14, 32, 38}

A maioria dos estudos clínicos tem usado os níveis séricos das aminotransferases para determinar a lesão hepática resultante da isquemia e reperfusão.^{39, 40} Essas enzimas são consideradas os marcadores mais sensíveis da lesão isquêmica do fígado; porém, as concentrações séricas destas não podem ser utilizadas como marcadores isolados da extensão da lesão irreversível na isquemia e reperfusão hepática.⁴¹

Portanto, corroborando com a redução nos níveis séricos da AST, demonstra-se também, neste estudo, um significativo aumento na produção de bile no grupo condicionado. A produção de bile, como parâmetro da função excretora do fígado, têm sido descrita como um importante marcador das lesões de isquemia e reperfusão hepática;⁴² além disso, a bilirrubina também têm sido descrita como um potente pigmento fisiológico, com função antioxidante, protegendo as células contra lesão oxidativa.^{43, 44} Neste estudo, a produção de bile no grupo-controle permaneceu constante durante todo o experimento; por outro lado, foi quase totalmente abolida em ambos os grupos durante a isquemia (dados não mostrados). Ao final do período de reperfusão, a produção acumulada de bile permaneceu bastante diminuída no grupo não condicionado; entretanto, foi aumentada significativamente no grupo condicionado com L-arginina.

A manutenção dos níveis séricos do NO, durante a reperfusão, pela administração de L-arginina, também tem demonstrado um efeito protetor pela redução do estresse oxidativo e pela diminuição da peroxidação lipídica.^{14, 32, 36, 37} Neste estudo, os níveis séricos obtidos do TBARS foram maiores no grupo não condicionado em relação aos outros dois grupos em praticamente todas as amostras coletadas. Entretanto, esses valores não foram estatisticamente significativos. Por outro lado, observa-se uma elevação significativa da SOD aos 60min da reperfusão no grupo condicionado com L-arginina, o que sugere um efeito protetor da L-arginina pela estimulação desse sistema antioxidante, bem como o envolvimento maior do radical superóxido, como espécie ativa de oxigênio, mediadora da lesão celular, como também referido previamente por outros autores.³⁷

Apesar da maior tendência ao envolvimento do superóxido nesse grupo, a capacidade de destoxificação dessa espécie reativa pela SOD parece ter sido suficiente, uma vez que os níveis séricos de TBARS foram semelhantes entre os grupos e, além disso, observou-se uma melhor preservação das células hepáticas no grupo condicionado. O aumento dos níveis do NO, pela infusão de L-arginina, pode também inativar o radical superóxido, oferecendo, dessa forma, proteção adicional contra as células endoteliais ou hepatócitos.^{32, 37} Esse mecanismo pode também ter ajudado na destoxificação do superóxido; porém, esses dados apenas podem ser inferidos, uma vez que a dosagem dos níveis de NO não foi objeto deste estudo.

Apesar de a lesão das membranas celulares, pela peroxidação lipídica, ser uma das hipóteses mais difundidas para explicar lesão provocada pelas espécies ativas do oxigênio, outros mecanismos da lesão celular induzida pelas espécies ativas do oxigênio têm demonstrado ser mais importantes e, dessa forma, os produtos da peroxidação lipídica poderiam ser apenas responsáveis pela amplificação e continuação da resposta inflamatória.⁴⁵

Jaeschke e cols.⁴⁵ usando diferentes modelos de indução de lesão hepática, pela peroxidação lipídica *in vivo*, observaram que, quando a peroxidação lipídica foi a causa de morte celular, uma grande variedade de parâmetros da lipoperoxidação, incluindo o malondealdeído hepático, aumentou de 20 a 50 vezes acima os níveis basais. Em outras palavras, virtualmente em todos os manuscritos de lesão hepática de isquemia e reperfusão, incluindo os resultados deste estudo (através da medida sérica do TBARS), os parâmetros da peroxidação lipídica aumentaram menos de três vezes os níveis basais.^{45, 46} Portanto, mediante uma análise quantitativa, poder-se-ia, também concordar com Jaeschke e cols.⁴⁵ quando referem que é difícil explicar que uma lesão severa, durante a reperfusão, poderia ser causada por uma peroxidação lipídica moderada. A importância da peroxidação lipídica na lesão de isquemia e reperfusão hepática representa uma importante área para futuras investigações.

A isquemia e reperfusão hepática, além de alterações metabólicas deletérias, pode induzir também modificações morfológicas nas células hepáticas. Em estudos prévios de isquemia e reperfusão hepática, tem-se observado alterações morfológicas compatíveis com lesão celular, demonstrado tanto pela microscopia óptica quanto pela microscopia eletrônica.^{14, 32, 47} Neste estudo, as mudanças histológicas e ultra-estruturais foram mais evidentes no grupo não condicionado. Dentre as alterações histológicas, observamos que o grupo não condicionado apresentou significativamente maior infiltração de polimorfonucleares nos sinusóides em relação ao grupo condicionado, o que foi previamente demonstrado por outros autores.^{4, 37}

A análise pela microscopia eletrônica demonstrou, em ambos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão, alterações nas mitocôndrias, porém, de maior intensidade no grupo não condicionado. A isquemia e reperfusão causou modificações na ultra-estrutura mitocondrial caracterizado por edema com perda da visualização das cristas mitocondriais, diminuição da densidade da matriz, e algumas mitocôndrias demonstraram *blebs* com ruptura da membrana mitocondrial externa, como previamente demonstrado por outros autores.^{14, 32}

Estudos prévios demonstraram que as células apoptóticas apresentavam condensação da cromatina e mitocôndrias intactas. Atualmente, em muitos modelos apoptóticos, muitas evidências sugerem que ocorrem mudanças significativas nas mitocôndrias, tais como: edema, megamitocôndria, picnose mitocondrial e rompimento da membrana mitocondrial externa.^{48, 49} De fato, atualmente, a mitocôndria tem sido implicada como organela fundamental na cascata da apoptose, pelo controle da liberação dos fatores que estimulam as fases tardias da morte por apoptose.⁵⁰ Esses fatores apoptogênicos incluem o citocromo c⁵⁰⁻⁵² e pode incluir também protease(s),⁵² incluindo aquelas da família das caspases.⁵³ O mecanismo pelo qual existe maior evidência para a liberação de fatores apoptogênicos pela mitocôndria é a formação de edema mitocondrial, que poderia ser induzido tanto pela transição da permeabilidade quanto por outro evento permeabilizador. Uma vez que a permeabilidade da membrana mitocondrial interna fica comprometida, forças osmóticas induzem a um aumento do volume da matriz mitocondrial, o que resulta, em última análise, na ruptura da membrana mitocondrial externa.⁵⁰ O método utilizado neste estudo, para quantificar o edema mitocondrial, através da medida da área da elipse, foi simples, rápido e foi concordante com os demais resultados obtidos neste estudo, para quantificar a lesão das células hepáticas.

Os dados obtidos neste estudo permitem supor que as mudanças na estrutura e função das mitocôndrias foram correlacionadas com a ativação e com o desenvolvimento da apoptose celular. Entretanto, os mecanismos exatos, pelos quais este condicionamento farmacológico protegeu a mitocôndria, permanecem desconhecidos.

Alguns autores sugerem que o alvo da citoproteção, associada com o NO, pode incluir aumento nos níveis da guanosina monofosfatada cíclica (GMPc) após a exposição dos hepatócitos ao NO, que estimula a GMPc proteína *kinase* (PKG) dependente, que por sua vez bloqueia a MPT e a subsequente morte celular por necrose.⁵⁴

O conhecimento das moléculas e vias envolvidas na apoptose tem sido motivo de recentes publicações. A quantificação da apoptose no tecido tem sido principalmente baseada no método TUNEL.^{14, 19, 32, 55} Atualmente, a via de sinalização mais investigada é a cascata das caspases, e a ativação das caspases, estabelece-se como uma característica típica da apoptose.^{55, 56} Muitas evidências existem para definir a caspase 3 como uma protease efetora da fase final da apoptose e em diretamente induzir a apoptose.⁵⁷ Estudos têm mostrado que o NO apresenta efeito antiapoptótico inibindo a atividade das proteases da família das caspases (caspases 3, 8 e 9),²³⁻²⁵ prevenindo da liberação do citocromo c,²³ entre outros. Neste estudo, usando a anticaspase 3 como método imunistoquímico, demonstra-se que o condicionamento com L-arginina reduziu a quantidade de células apoptóticas. Em outras palavras, as células apoptóticas foram significativamente aumentadas no grupo não condicionado em comparação ao grupo condicionado com L-arginina (aproximadamente 2,5 vezes). Resultados semelhantes foram observados por outros autores, porém através da quantificação com o método TUNEL.^{14, 32} Além disso, no grupo condicionado, a atividade da caspase 3 foi maior que no grupo-controle, porém; o escore de células apoptóticas encontradas entre esses dois grupos não foi estatisticamente diferente.

A cronologia da morte celular não foi objetivo principal deste estudo; porém, seus dados corroboram com a já estabelecida suscetibilidade das células endoteliais dos sinusóides à apoptose. Demonstra-se que o escore das células endoteliais dos sinusóides apoptóticas foi significativamente maior que o escore dos hepatócitos apoptóticos. Estudos prévios de isquemia e reperfusão hepática normotérmica e hipotérmica descreve as células endoteliais dos sinusóides como as primeiras células a sofrerem apoptose após a reperfusão.^{18, 58, 59} Apesar disso, contrariando esses dados, alguns poucos autores observaram raras células sinusoidais apoptóticas após isquemia e reperfusão quente em fígado de suínos.¹⁴

Tem-se descrito que as áreas periportais são consideradas mais resistentes à isquemia que as áreas centro-lobulares, em que a hipóxia mais severa causa

freqüentemente necrose. Esses mesmos autores sugerem que a L-arginina pode ser mais efetiva nas áreas cujos hepatócitos sofrem danos leves e ainda seriam capazes de recuperar-se da lesão.^{14, 32} Interessantemente, o escore de células apoptóticas nas zonas centro-lobular e portal foram semelhantes neste estudo, também contrariando dados da literatura.^{14, 32}

Esses achados podem, por outro lado, ser explicados pelo modelo experimental aplicado neste estudo (isquemia hepática global), ou seja, na isquemia sem fluxo sanguíneo (*no-flow ischemia*), o fígado inteiro ou o lobo isquemiado torna-se anóxico; por outro lado, na hipóxia (*low-flow hypoxia*), as regiões pericentrais (centro-lobular), e não as regiões periportais do fígado comprometido tornam-se anóxicas e mais suscetíveis à lesão.⁶⁰ Devido ao duplo suprimento sanguíneo hepático, a necrose pericentral, decorrente da hipoxia por baixo fluxo (*low-flow hypoxia*), é mais comumente encontrada e é um freqüente achado em autópsias.⁶⁰

Este estudo foi designado para observar as alterações das células hepáticas na fase precoce da reperfusão (início da reperfusão até a terceira ou quarta hora), o que pode ter subestimado alguns resultados, especialmente em relação ao modo da morte celular (apoptose ou necrose) e aos efeitos tardios da via da L-arginina/NO. Recentemente, a apoptose tem sido implicada como a principal via de morte celular durante a isquemia e reperfusão hepática normotérmica por alguns autores;^{19, 59, 61} por outro lado, outros trabalhos concluíram que a principal maneira de morte celular durante a isquemia e reperfusão hepática seria mais pela necrose que pela apoptose.^{55, 62}

Nesse contexto, parece que ambas as formas de morte celular coexistem,^{3, 50, 63} ou ocorrem em sequência, dependendo da natureza e da severidade da agressão e na dependência da condição da célula afetada.³ Estudos prévios, usando modelos de isquemia e reperfusão hepática normotérmica, têm demonstrado que ambas populações de células hepáticas sofrem apoptose após a reperfusão, com um máximo de lesão observado 3 horas após a reperfusão.

Esse tipo de lesão ocorre precocemente, bem antes da evidência da necrose, que foi aparente somente 6 a 24 horas após a cirurgia.^{18, 19, 58, 59}

Helling e cols.⁶⁴ recentemente demonstraram, em um modelo experimental em suínos, que células apoptóticas detectáveis dobraram quando a reperfusão foi prolongada de 60 minutos para dois ou quatro dias. Makoto e cols.⁶² em um modelo experimental, também em suínos, de isquemia prolongada (180 minutos), seguida por um período de reperfusão, concluíram que o modo principal de morte celular, durante a lesão de isquemia e reperfusão hepática normotérmica, foi a necrose, e a apoptose não foi dominante. A apoptose apresentou um pico 6 horas após a reperfusão e decresceu gradualmente após esse período. Contrariamente, a necrose apareceu a partir de 9 horas da reperfusão e aumentou gradualmente até 24 horas após a reperfusão. Schulz e cols.⁴¹ em outro modelo experimental em suínos de isquemia prolongada (120 minutos), seguido de 480 minutos de reperfusão, precedido de condicionamento isquêmico, demonstraram que menos de 1% dos hepatócitos foram necróticos ou apoptóticos.

Similarmente, neste estudo, a necrose foi mínima em todos os grupos; porém, as células apoptóticas foram mais freqüentes após 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Esses resultados poderiam ser principalmente explicados pela duração da reperfusão, mais do que pela duração da isquemia *per se*. Portanto, embora dados deste experimento também sugiram que a apoptose é a principal modalidade de morte celular na fase precoce da reperfusão hepática, o número absoluto de células apoptóticas e a quantidade de células necróticas podem ter sido subestimados, devido ao curto período de reperfusão utilizado nesse modelo experimental (180 minutos).

Embora os níveis de NO não tenham sido determinados direta ou indiretamente neste estudo, acredita-se que a administração de L-arginina intraportal aumentou a produção de NO na fase precoce da reperfusão, sem ser nociva ao fígado, o que foi demonstrado pelos efeitos hepatoprotetores observados nesse modelo experimental. O peroxinitrito, espécie altamente reativa, gerada quando o NO em

excesso reage com superóxido,^{15, 16} não parece ter sido envolvido nocivamente nesse experimento. Essa hipótese baseia-se nos resultados benéficos deste estudo, e em estudos prévios, que demonstram que, mesmo com infusões sanguíneas de altas doses de L-arginina (100 mg/kg – 600 mg/kg), relativamente baixas quantidades de NO foram produzidas na fase precoce da reperfusão.^{7, 12, 37, 65}

O modelo experimental escolhido justifica-se pelo fato de que, em suínos, diferentemente que em ratos, a tolerância hepática à isquemia normotérmica prolongada é similar ao fígado dos humanos. Portanto, animais de grande porte, tais como os suínos, utilizados neste estudo, demonstram maior semelhança na fisiologia e anatomia com os humanos e são, dessa maneira, mais compatíveis para estudar problemas de relevância clínica.⁶⁶ O pequeno número de animais estudados (seis por grupo) é uma das principais limitações deste estudo, o que permite dizer que os dados podem ter falhado em encontrar diferença estatisticamente significativa nos efeitos de tamanho moderado e pequeno; por outro lado, as diferenças estatisticamente significativas encontradas neste estudo podem ser seguramente aceitas.

Outra possível limitação deste estudo pode ter sido o método utilizado para determinar a peroxidação lipídica (concentração sérica do TBARS), o qual não demonstrou o estresse oxidativo como o mais importante componente da lesão tecidual, contrariando os resultados dos testes hepáticos utilizados neste estudo e a avaliação morfológica das células hepáticas, que demonstraram claramente a proteção do condicionamento.

Burra e cols.³² em um modelo experimental de isquemia e reperfusão em suínos, avaliando os efeitos protetores da L-arginina, pela infusão intravenosa, também não observaram diferença na concentração sérica do TBARS em relação ao grupo-controle (isquemia e reperfusão apenas); por outro lado, observaram que o grupo tratado com L-arginina demonstrou efeitos protetores na peroxidação lipídica tecidual (hepática) e na morfologia hepática. Esse e outros estudos, usando condicionamento farmacológico com L-arginina, têm

demonstrado a não-correlação entre os níveis teciduais (significativamente mais baixos que os encontrados nos controles) e séricos de malondealdeído.^{14, 32}

Além disso, estudos com o condicionamento isquêmico têm demonstrado resultados concordantes entre as concentrações teciduais de malondealdeído e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no tecido hepático, com os resultados encontrados nos testes de função e avaliação morfológica hepatocelular.⁶⁷ Portanto, a correlação entre os níveis séricos e teciduais dos parâmetros de peroxidação lipídica e dos sistemas antioxidantes enzimáticos CAT e SOD são, também, uma importante área para investigações futuras.

Os efeitos benéficos do condicionamento farmacológico, com a infusão de L-arginina intraportal, foram claramente demonstrados durante a fase precoce da reperfusão nesse modelo experimental. Esses dados fortalecem a idéia de que estratégias para prevenir ou diminuir as lesões hepáticas de isquemia e reperfusão quente, mediante estimulação da produção de NO hepático, são factíveis e promissoras, porém ainda um campo para futuras investigações.

Os mecanismos exatos do efeito protetor da L-arginina exógena no tecido hepático ainda não são conhecidos, mas podem estar associados à melhor preservação da ultra-estrutura mitocondrial. O potencial de aplicabilidade real da L-arginina, em situações clínicas, necessita ser comprovado por meio de estudos clínicos em humanos.

Tabela 1 – Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos tratados ou não com a infusão de L-arginina intraportal sobre os níveis séricos da aspartato aminotransferase, alanina amonotransferase e na produção de bile.

Característica	Grupo controle	Grupo IR	Grupo L-a+IR	P
	n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	
AST pré-isquemia (UI/L)	37,7±14,6	32,3±14,9	37,5±13,5	0,77
AST 180 min de reperfusão (UI/L)	46,2±23,7 ^a	702,2±118,1 ^c	363,3±115,7 ^b	<0,01
ALT pré-isquemia (UI/L)	31,3±4,4	23,7±7,9	25,7±9,3	0,22
ALT 180 min de reperfusão (UI/L)	27,0±6,9 ^a	57,2±17,5 ^b	36,8±16,3 ^{a,b}	0,01
Produção de bile (mL/180min de reperfusão)	49,3±8,4 ^c	5,3±3,3 ^a	28,0±5,6 ^b	<0,01

$\bar{X} \pm DP$: média±desvio padrão; ANOVA seguido pelo teste de Tukey; P<0,05

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa ao teste de *post-hoc*; Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

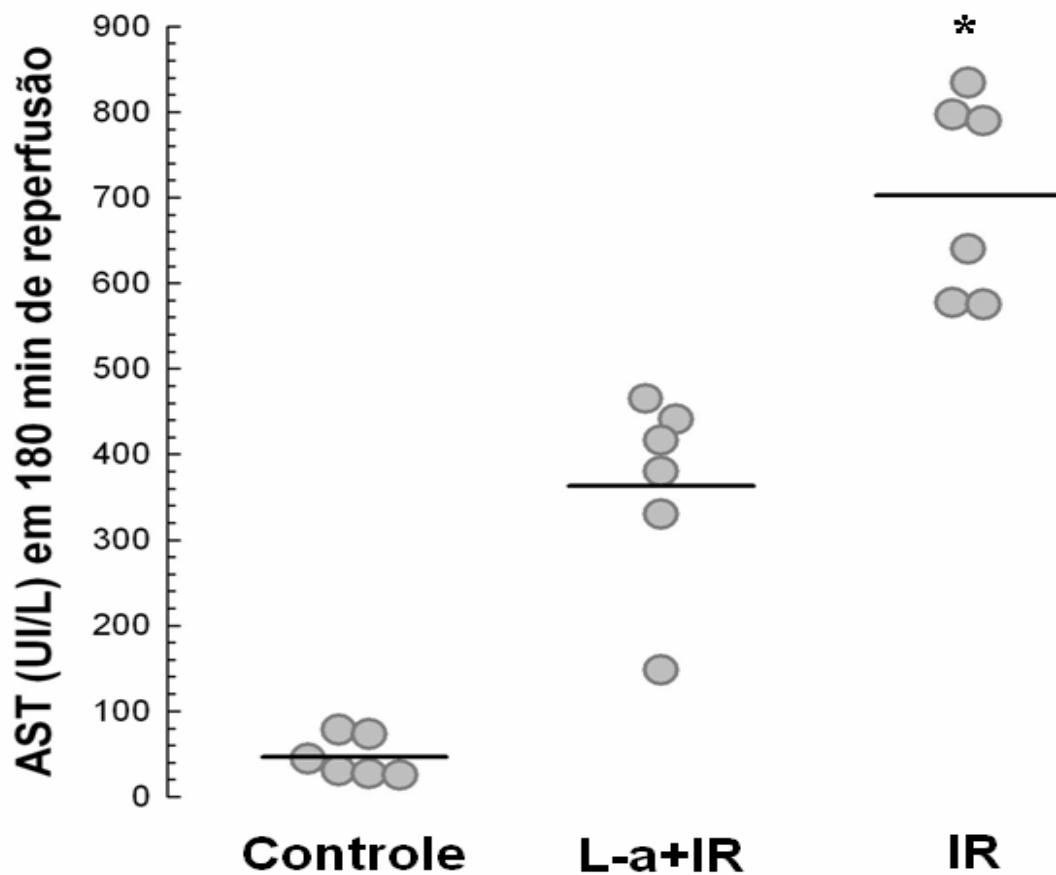


Figura 1 – Níveis séricos de asparatato aminotransferase (AST), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. *Os níveis de AST foram mais elevados no grupo IR em relação ao grupo L-a+IR e em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperfusão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$.

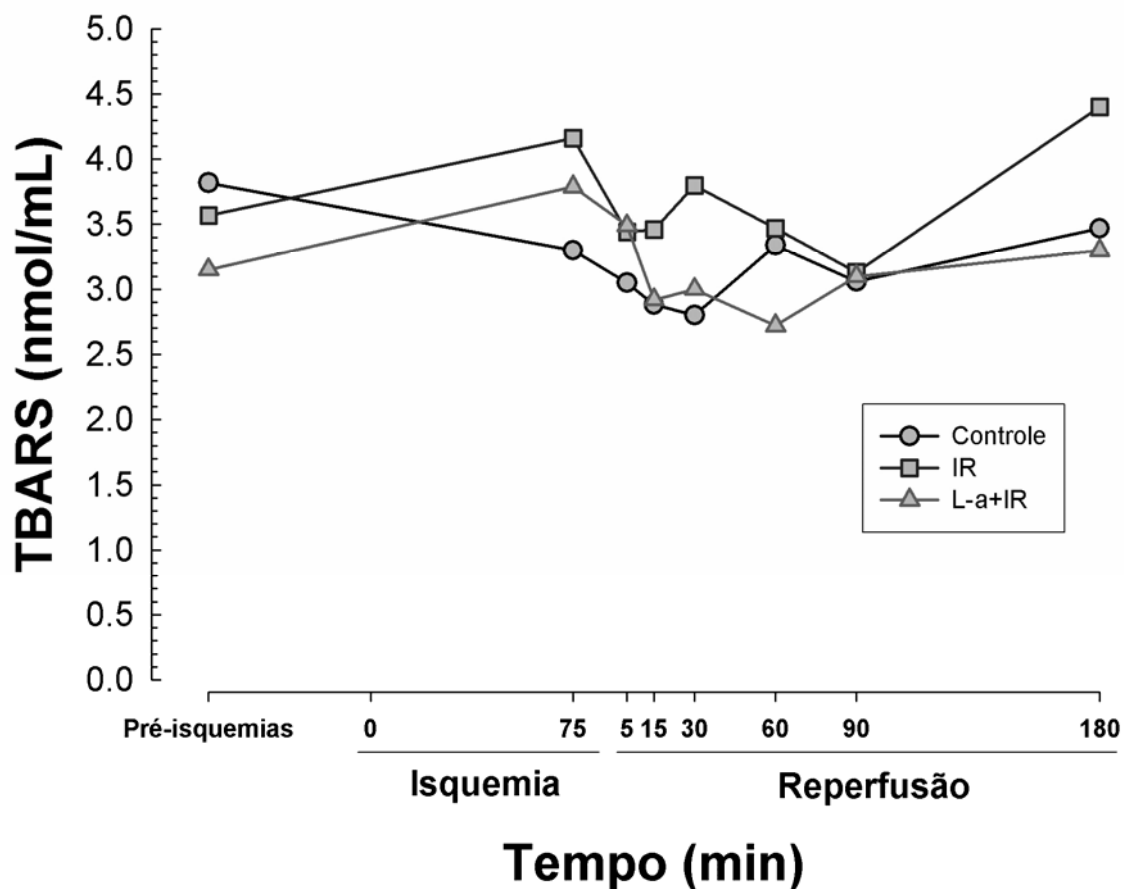


Figura 2 – Níveis séricos médios das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em um modelo de isquemia e reperusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. Os níveis de TBARS não foram estatisticamente significativos em nenhum dos momentos entre os grupos ($P > 0,05$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: precondicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperusão. Análise de variância de medidas repetidas; $P < 0,05$.

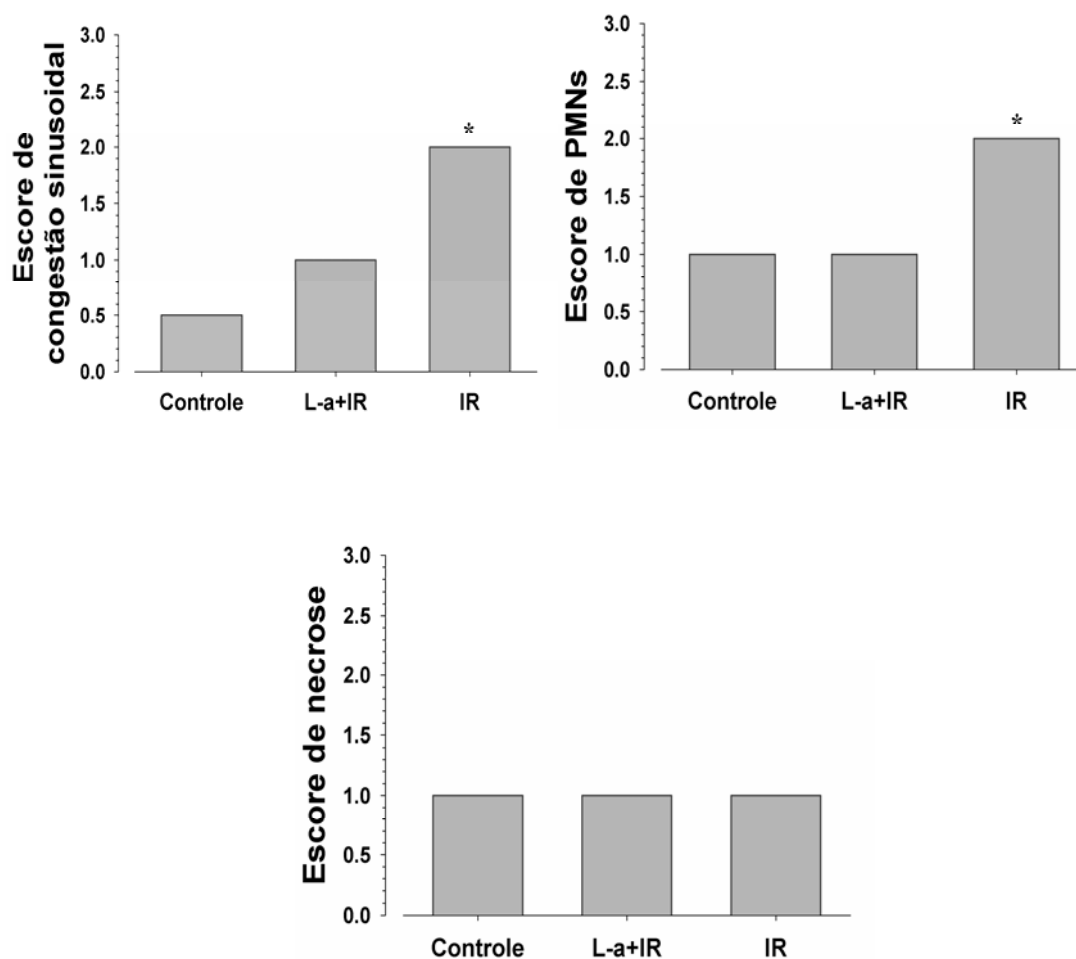


Figura 3 – Escore de lesão (mediana) hepática avaliada por meio da microscopia óptica, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. *A congestão sinusoidal foi significativamente maior no grupo IR versus grupo-controle ($P=0,02$). *A infiltração de polimorfonucleares (PMNs) foi significativamente maior no grupo IR em relação ao grupo L-a+IR e ao grupo-controle ($P=0,01$). A necrose não foi diferente entre os três grupos ($P=0,24$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperfusão. Os escores foram ordenados em postos e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey; $P<0,05$.

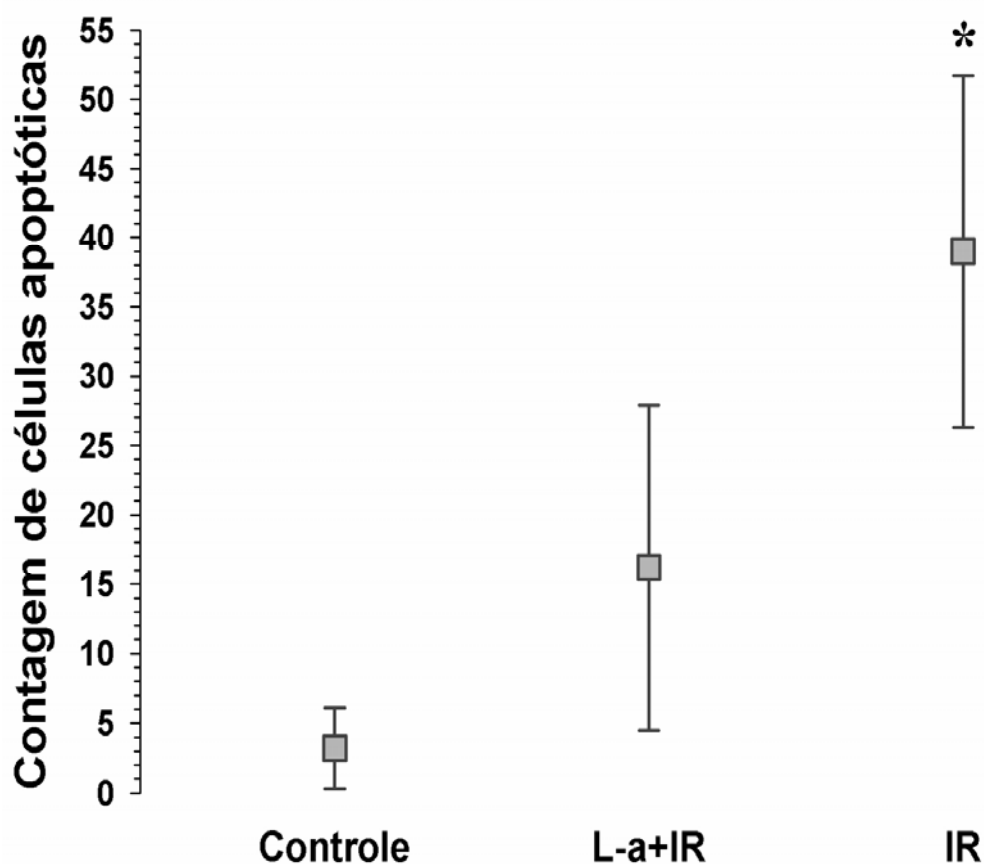
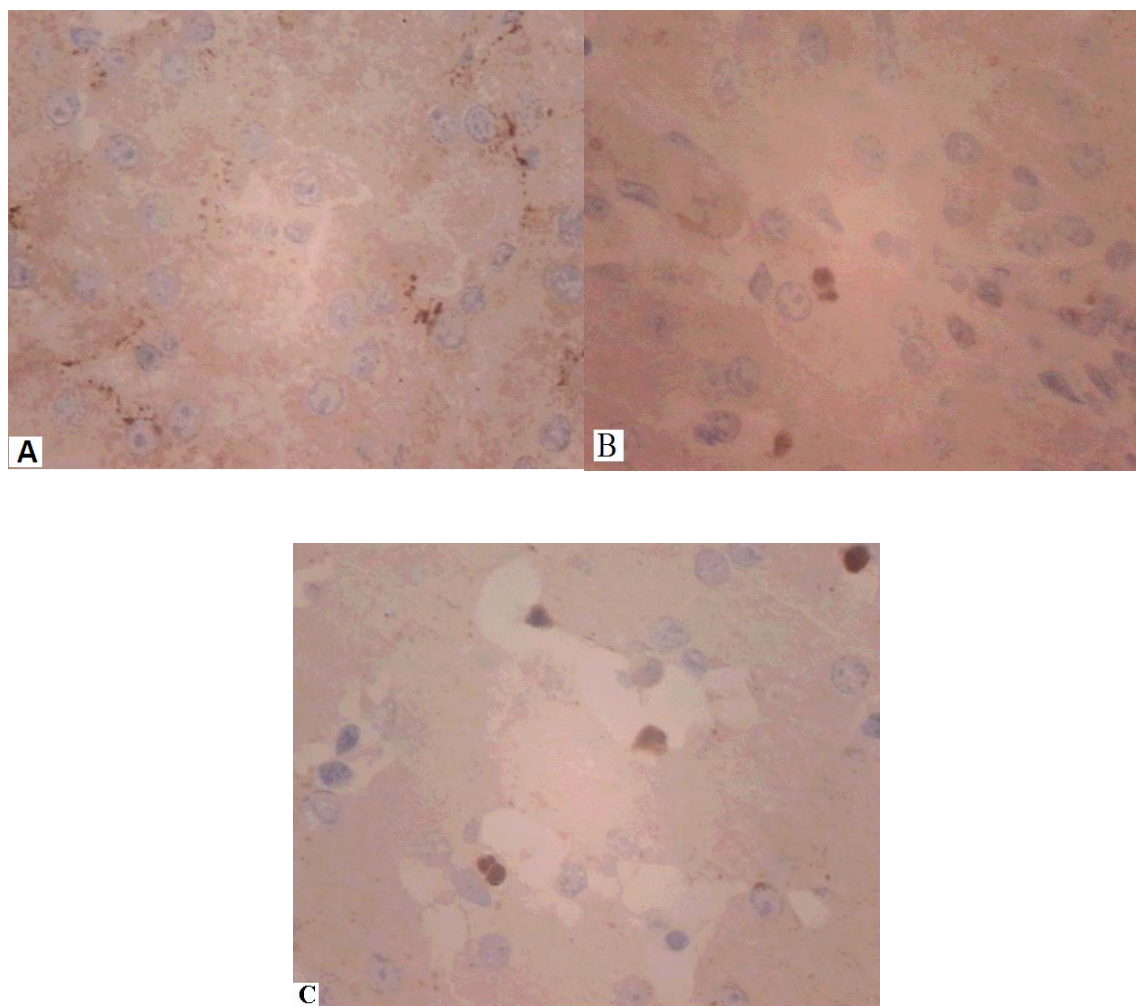
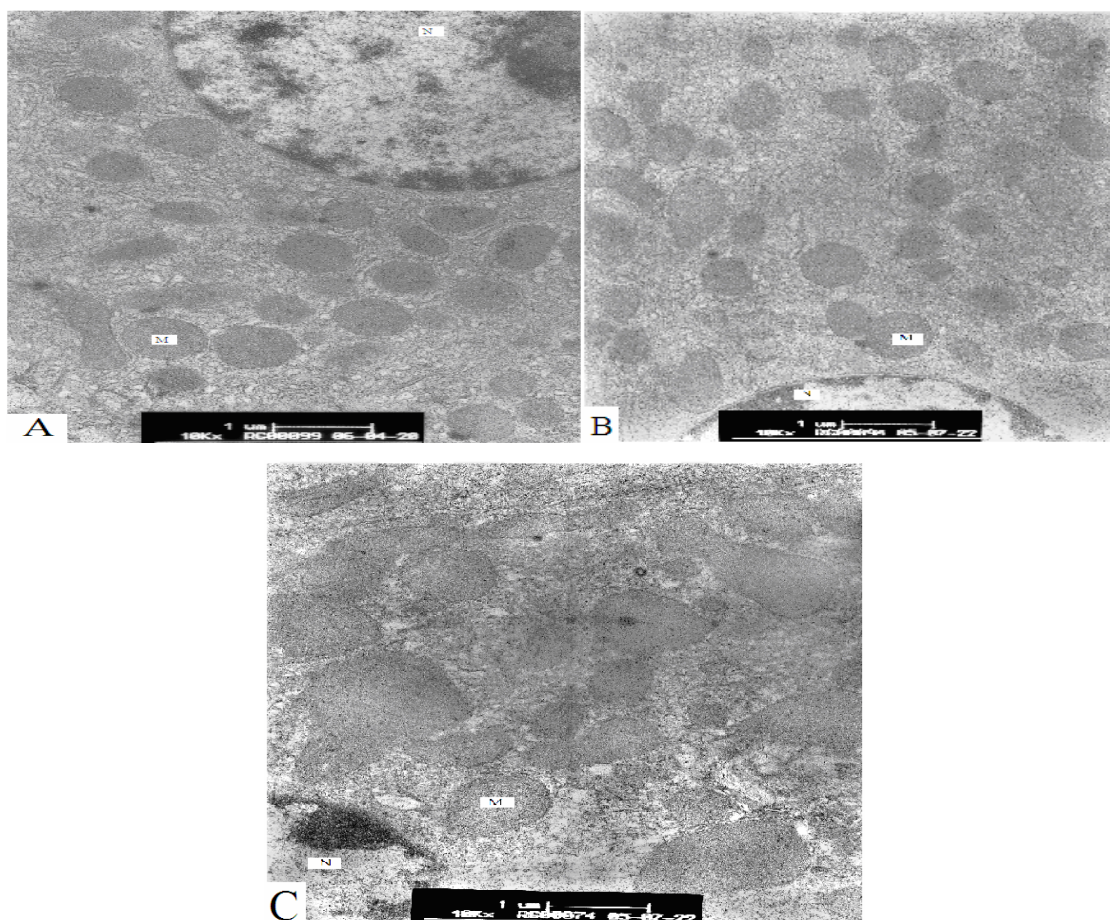


Figura 4 – Escore total das células apoptóticas (hepatócitos + células sinusoidais), avaliado pela técnica imunohistoquímica pelo anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) ao microscópio óptico, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. *O escore total de células apoptóticas no grupo IR ($39,0 \pm 12,7$), foi significativamente maior que o encontrado no grupo L-a+IR ($16,2 \pm 11,7$) e que o encontrado no grupo-controle ($3,2 \pm 2,9$) ($P < 0,01$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperfusão. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$.



Fotos 5A, B, C – Imunoistoquímica representativa de amostra do tecido hepático corado pelo anticorpo policlonal anticaspase 3 clivada (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, EUA) ao microscópio óptico (ampliação 400x), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. A) grupo controle, hepatócitos e células sinusoidais não demonstram atividade da caspase 3; B) grupo L-a+IR, raros hepatócitos e células sinusoidais apoptóticas; C) grupo IR, várias células sinusoidais e hepatócitos apoptóticos. Grupo controle: sham operation; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperfusão.



Figuras 6A, B, C – Fotos representativas da ultra-estrutura das mitocôndrias de amostras do tecido hepático a microscopia eletrônica (magnification x 10000), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. A) grupo-controle, estrutura mitocondrial normal; B) grupo L-a+IR, mitocôndrias levemente edemaceadas, membrana mitocondrial visível; C) grupo IR, mitocôndrias edemaceadas, disformes, membrana mitocondrial pouco visível, algumas parcialmente rompidas, dificuldade de visualização das cristas e presença de grande quantidade de vacúolos no citoplasma. Grupo controle: sham operation; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperfusão. M: mitocôndria; N: núcleo.

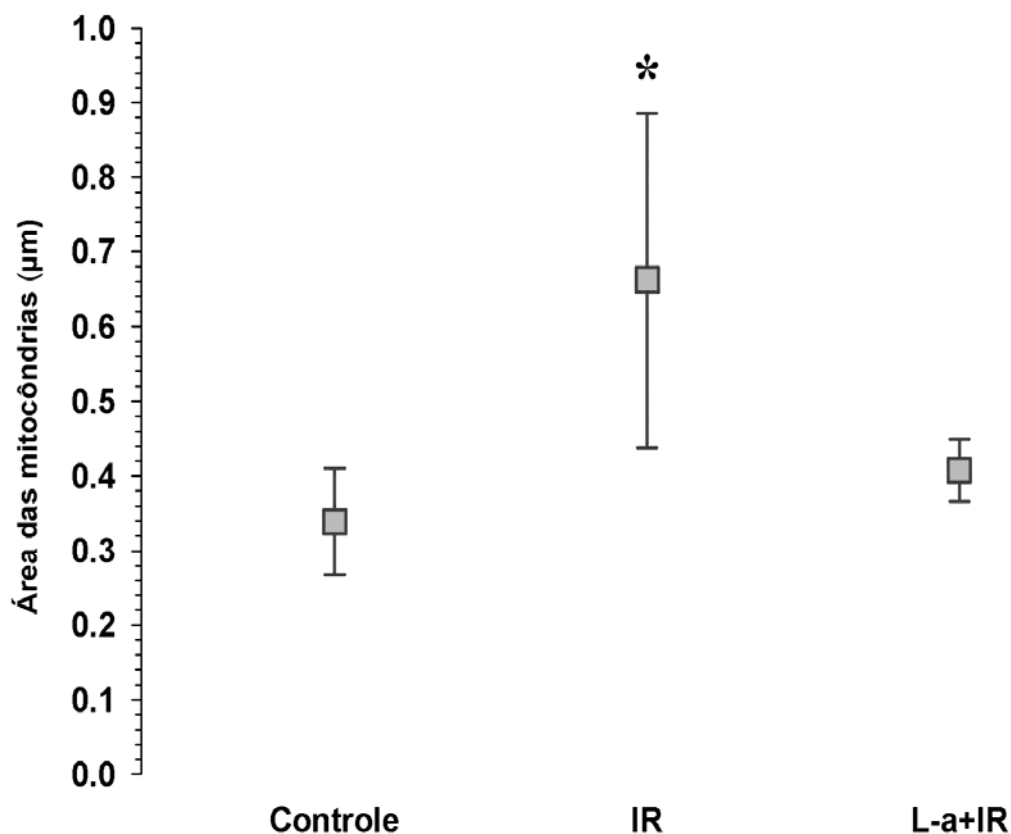


Figura 7 – Edema mitocondrial calculado pela média da área de 10 mitocôndrias próximas ao núcleo, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos pré-tratados (precondicionamento) ou não com L-arginina. *A área das mitocôndrias foi estatisticamente maior no grupo IR ($0,6623 \pm 0,2241 \mu\text{m}$) em relação ao grupo-controle ($0,3391 \pm 0,0714 \mu\text{m}$) e em relação ao grupo L-a+IR ($0,4077 \pm 0,0416 \mu\text{m}$) ($P < 0,01$). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: Isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo L-a+IR: condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal (400 mg/kg) 10 minutos antes da isquemia de 90 minutos seguidos de 180 minutos de reperfusão. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$.

REFERÊNCIAS

1. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;**20**(5): 383-396.
2. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *Faseb J* 2005;**19**(9): 1155-1157.
3. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 149-159.
4. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Rodes J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;**71**(4): 529-536.
5. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003;**9**(1): 1-11.
6. Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002;**36**(3): 573-581.
7. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998;**66**(5): 579-585.
8. Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;**29**(3): 809-813.
9. Geller DA, Chia SH, Takahashi Y, Yagnik GP, Tsoulfas G, Murase N. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;**25**(3): 142-147.

10. Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997;**27**(1): 163-169.
11. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;**59**(6): 772-779.
12. Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, Okuhama Y, Kusano T, Muto Y. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;**69**(2): 429-434.
13. Ferrarresso M, Burra P, Cadrobbi R, Calabrese F, Pettenazzo E, Sarzo G, Parnigotto A, Bacelle L, Rigotti P. Protective effect of L-arginine on liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1997;**29**(1-2): 393-394.
14. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrarresso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997;**183**(4): 477-485.
15. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;**268**(5 Pt 1): L699-722.
16. Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995;**108**(2): 603-605.
17. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;**271**(5 Pt 1): C1424-1437.
18. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999;**68**(1): 89-96.
19. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;**67**(8): 1099-1105.

20. Ishigami F, Naka S, Takeshita K, Kurumi Y, Hanasawa K, Tani T. Bile salt tauroursodeoxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;**72**(11): 1803-1807.
21. Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999;**276**(5 Pt 1): G1069-1073.
22. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**282**(5): 1075-1079.
23. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000;**32**(4 Pt 1): 770-778.
24. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res* 2002;**62**(6): 1648-1653.
25. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999;**284**(5414): 651-654.
26. Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006;**79**(20): 1881-1894.
27. Wills ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966;**99**(3): 667-676.
28. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;**32**: 279-312.
29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;**105**: 121-126.
30. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent

mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002;**8**(11): 990-999.

31. Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;**10**(13): 1934-1938.

32. Burra P, Chirizzi L, Cardin R, Cadrobbi R, Baldan N, Calabrese F, Pettenazzo E, Calo L, Plebani M, Rigotti P. Warm hepatic ischemia in pigs: effects of L-arginine and oligotide treatment. *J Invest Surg* 2001;**14**(6): 303-312.

33. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;**17**: 208-212.

34. Altman DG. Statistics in medical journals: developments in the 1980s. *Stat Med* 1991;**10**(12): 1897-1913.

35. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;**32**(6): 1280-1288.

36. Lanteri R, Acquaviva R, Di Giacomo C, Caltabiano R, Li Destri G, Vanella L, Santangelo M, Lanzafame S, Di Cataldo A. Heme oxygenase 1 expression in postischemic reperfusion liver damage: effect of L-arginine. *Microsurgery* 2006;**26**(1): 25-32.

37. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, Furukawa H, Starzl TE, Todo S. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999;**188**(1): 43-52.

38. van Wagensveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, Gouma DJ. Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 376-384.

39. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 369-375.

40. Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997;**226**(6): 704-711; discussion 711-703.
41. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**(1): H198-207.
42. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987;**42**(5): 565-569.
43. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;**4**(5): 749-758.
44. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;**235**(4792): 1043-1046.
45. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 127-140.
46. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;**15**(7): 718-724.
47. Man K, Lo CM, Liu CL, Zhang ZW, Lee TK, Ng IO, Fan ST, Wong J. Effects of the intermittent Pringle manoeuvre on hepatic gene expression and ultrastructure in a randomized clinical study. *Br J Surg* 2003;**90**(2): 183-189.
48. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000;**25**(7): 319-324.
49. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 1999;**46**(2): 223-237.
50. Murphy A. Potential Mechanisms of Mitochondrial Cytochrome-c Release During Apoptosis. *Drug dev res* 1999:18-25.

51. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;**275**(5303): 1132-1136.
52. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;**183**(4): 1533-1544.
53. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;**140**(6): 1485-1495.
54. Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2004;**39**(6): 1533-1543.
55. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;**33**(2): 397-405.
56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;**281**(5381): 1312-1316.
57. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;**9**(1): 35-49.
58. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;**30**(5): 1223-1231.
59. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(6): 1652-1660.
60. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;**43**(2 Suppl 1): S31-44.
61. Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S. Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during

warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;**281**(4): G1115-1123.

62. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, Matsuno T, Nui A, Hirata K. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 2002;**73**(9): 1439-1446.

63. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;**276**(1 Pt 1): G1-6.

64. Helling TS, Edwards CA, Helling TS, Jr., Chang CC, Hodges MC, Dhar A, VanWay C. Hepatic apoptotic activity following transient normothermic inflow occlusion and reperfusion in the swine model. *J Surg Res* 1999;**86**(1): 70-78.

65. Higa T, Shiraishi M, Mamadi T, Taira K, Oshiro T, Nozato E, Nagahama M, Muto Y. Limitations of exogenous L-arginine in exerting a cytoprotective effect on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surg Today* 2000;**30**(4): 352-359.

66. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg* 2006;**19**(2): 113-123.

67. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock* 2005;**24**(4): 370-375.

8.2. Versão em inglês

PHARMACOLOGICAL PRE-CONDITIONING USING INTRAPORTAL INFUSION OF L-ARGININE PROTECTS FROM HEPATIC ISCHEMIA REPERFUSION INJURY BY BY PRESERVATION MITOCHONDRIAL STRUCTURE AND DOWNREGULATION OF CASPASE 3 ACTIVITY.

Rafael Omar Giovanardi, MD¹

Ernani Luis Rhoden, MD, PhD²

Carlos Thadeu Cerski, MD, PhD³

Miriam Salvador, PhD⁴

From Post-graduating Course of Medical Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

¹ Professor of Department of Surgery at University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

² Professor of Post-graduating course of Medical Sciences at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³ Professor of Pathology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

⁴ Professor of Department of Biochemistry at University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

Correspondence and reprints requests: Rafael Omar Giovanardi, Departamento de clínica cirúrgica da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil. Rua vinte de Setembro, 1695, Caxias do Sul, RS, Brasil. CEP 95020-450. Fone/Fax: 55 54 3223 1257.

Key words: liver injury, ischemia/reperfusion, Nitric oxide, L-arginine, apoptosis.

Running Title: Intraportal infusion of L-arginine protects from hepatic ischemia reperfusion injury.

ABSTRACT

AIM: The involvement of the nitric oxide (NO) pathway in the reperfusional ischemic phenomenon is complex and not fully understood, as are the effects of intraportal infusion of L-arginine (substrate for the NO synthesis), during the early phase of the ischemia-reperfusion injury in pig livers. To examine the beneficial or harmful effects of intraportal infusion of L-arginine, during the early phase of ischemia-reperfusion injury in pig livers, observing changes in the liver cell morphology, apoptosis/necrosis and changes in the mitochondrial ultrastructure.

METHODS: A pig model of 90 minutes of hepatic ischemia and 180 minutes of reperfusion under passive venovenous bypass was established. Eighteen female hybrid pigs were randomly divided into sham-operated group, non-preconditioned group and pharmacologically preconditioned group (intraportal infusion in bolus of L-arginine 400 mg/kg) 10 minutes before the ischemia and reperfusion. Serum concentration of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and serum activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. The bile flow was continuously measurement. Liver biopsies were taken at 180 min after reperfusion for histological and ultrastructural examination. Apoptotic cells were measured by immunohistochemical technique (anti-caspase-3). Mitochondrial ultrastructure was observed by electron microscope.

RESULTS: The pharmacologically preconditioned increased bile flow ($P < 0.01$) and improved serum AST level ($P < 0.01$) when compared with non-preconditioned group. The serum concentration of TBARS did not differ between the three groups, while the activity of antioxidant enzymes SOD was significantly higher in pharmacologically preconditioned group only at 60 minutes of reperfusion ($P = 0.04$). The sinusoidal congestion ($P = 0.02$) was more evident in the non-preconditioned group when compared with sham operated group. The infiltrating PMNs ($P = 0.01$) were statistically more evident in the non-preconditioned group when compared with sham and pharmacologically preconditioned group. Under light microscope, anti-caspase-3 staining indicated that cell injury occurred primarily in the form of apoptosis at the early stage of reperfusion and the

pharmacologically preconditioned group showed approximately 2.5-fold less caspase-3 activity when compared with the non-preconditioned group ($P < 0.01$). The injury of mitochondrial ultrastructure in pharmacologically preconditioned group was also obviously reduced ($P < 0.01$).

CONCLUSION: In this study, we showed that apoptosis was a prominent feature of ischemia-reperfusion injury of the liver cells in the early phase of reperfusion and the intraportal infusion of L-arginine inhibited apoptosis of the liver cells which was associated with better preservation of mitochondria structure and inhibition of caspase-3 activity.

INTRODUCTION

Hepatic ischemia/reperfusion injury is a major cause of liver dysfunction and occurs after several forms of shock, liver surgery for trauma or cancer, and liver transplantation.¹⁻⁴ The mechanisms associated with ischemia/reperfusion injury have not yet been fully explained, but this process appears to result from an acute inflammatory response and a microvascular dysfunction, which ultimately leads to irreversible cell injury. A large number of mediators have been implicated in the pathogenesis of the vascular injury that occurs in ischemia/reperfusion, including nitric oxid, which appears to have different physiological functions in the body.^{5, 6}

NO protects the liver by improving microcirculation through a vasodilator effect, anti-platelet effect, inhibition of neutrophil activation, neutralization of toxic free radicals, as well as by having an anti-apoptotic effect.⁶ The manipulation of NO bioactivity by inhibiting or increasing it in experimental models shows the role of NO in hepatic ischemia/reperfusion injuries,^{4, 7, 8} while administering inhibitors of nitric oxide synthase (NOS), the enzyme that is responsible for NO synthesis, increases injury in animal models of ischemia/reperfusion;^{8, 9} infusion of NO donors or supplementation with NO precursors (such as L-arginine) minimize the hepatic injury by ischemic reperfusion improving microcirculation.^{4, 7, 9-14} These studies support the concept that there is a hepatic deficiency in the bioavailability of NO during the early phase of reperfusion.

On the contrary of cytoprotective activity, NO may also be cytotoxic, since it reacts with reactive oxygen species (superoxide) forming peroxynitrite.^{15, 16} These events may culminate in lipid peroxidation, cell death and hepatic injury.^{16, 17} The determination of NO as a cytoprotector and not as a cytotoxic agent under some clinical circumstances may be verified by the occurrence of apoptosis, an important process in the development of ischemia/reperfusion injury.¹⁸⁻²⁰ In this context, studies show that NO may have a pro-apoptotic or anti-apoptotic effect.^{21, 22} i.e., NO or its biological products can promote apoptosis by multiple

potential mechanisms including induction of cytochrome c release through a permeability transition, for direct injury on the DNA, or even through caspase-activating pathways.²² On the other hand, recent studies suggest that, even at high levels, NO may have a protective role against liver parenchyma injury, involving anti-apoptotic pathways associated with caspases 3, 8 and 9.²³⁻²⁵

The effect of the L-arginine/NO pathway on the hepatic ischemia/reperfusion injury besides being complex is still controversial, and may be associated with both cytoprotective and cytotoxic effects.²⁶ Furthermore, most of the experimental studies to assess warm ischemia/reperfusion injuries of the liver report peripheral or peritoneal intravenous infusion of L-arginine as a way of maintaining the NO levels in reperfusion. Our study was performed to examine the beneficial or harmful effects of the intraportal infusion of L-arginine (considered a substrate for NO synthesis), in the early phase of warm ischemia/reperfusion injury in pig livers, particularly observing changes in the liver cells morphology, presence of apoptosis/necrosis and modifications of the mitochondrial structure.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Operative Procedures

This study was approved by the Bioethics Committee at the University of Caxias do Sul and was performed in compliance with ethical guidelines for animal studies. Eighteen female hybrid pigs weighing 18 to 23 kg were used. After overnight fasting, the animals were anesthetized with thiopental sodium (Cristália, Brazil) (0.5 mg/kg, intravenously) after sedation with ketamine hydrochloride (Cristália, Brazil) (2.0 mg/kg, intramuscularly) and atropine sulfate (Cristália, Brazil) (0.025 mg/kg, IM). The trachea was intubated for connection to a respirator (Takaoka model KT-13, series Sansei plus, Brazil) and the animals underwent general anesthesia with a mixture of oxygen and isoflurane (Isoforine - Cristália, Brazil). Through the cervical incision, the right carotid artery and both internal jugular veins were isolated. The artery was cannulated with a polyethylene catheter for the measurement of mean arterial pressure. The jugular veins were cannulated for volume replacement using warmed 0.9% saline and for the measurement of central venous pressure. The temperature was monitored with a thermometer introduced through a small incision in the axial region. and body temperature was kept above 37°C by using heated drapes. The electrocardiogram and oxymetry were also monitored continuously during the operation. Through a midline incision, the liver was completely skeletonized by dividing all the hepatic suspensory ligaments. The portal vein, hepatic artery, and common bile duct were isolated, and their collaterals were separately occluded. Hepatic ischemia was induced by clamping the portal vein and the hepatic artery under extracorporeal circulation. The venovenous bypass was used through the splenic vein to the left internal jugular vein with a polyethylene tube without a pump. The bypass was maintained under conditions of systemic heparinization 5 minutos before ischemia. The common bile duct was cannulated and drained to an unpressurized reservoir to continuously measure bile flow; the cystic duct was occluded. Hepatic ischemia was maintained for 90 min, and reperfusion was subsequently performed by releasing the clamp. Congestion of the small intestine

was not observed macroscopically during the experiment. No animals were given vasopressor drugs. The pigs were killed 3 hrs after reperfusion.

Blood samples (5ml) were obtained in heparinized tubes at the beginning of laparotomy; before reperfusion (at 75 minutes of ischemia); at 5, 15, 30, 60, 90 and 180 min after reperfusion. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum concentration of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. Liver biopsies were taken at 180 minutes after reperfusion for histological and ultrastructural examination, and apoptosis evaluation.

Experimental Design

The pigs were randomly allocated to three study groups of six pigs each. Sham-operated group: the liver was exposed for 5 h, there was no liver ischemia (animals subjected to anesthesia, laparotomy and dissection of structures without hepatic ischemia); non-preconditioning group (IR group): animals subjected to 90 minutes of ischemia followed by a 180 min period of reperfusion; pharmacologically preconditioned (L-a+IR group): 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a preconditioning protocol, i.e. , intraportal infusion of L-arginine 400 mg/Kg (Sigma Química, Brasil).

Biochemical Assessment of liver cytolysis (Serum Enzyme Analysis)

Blood samples were obtained at the beginning of laparotomy and at the end of the reperfusion period. Blood was centrifuged and the plasma separated. Irreversible hepatic damage was evaluated by measuring alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The AST and ALT determinations were performed with the SELECTRA II Merck[®] automated system using the colorimetric enzymatic method with a commercial kit from

Labtest Diagnóstica SA (Labtest Diagnóstica SA, Brazil). The results were expressed in UI/L.

Excretory Liver Function

Bile production, as a parameter of excretory liver function, was monitored continuously during the reperfusion period. The common bile duct was cannulated (the cystic duct was occluded) and drained to an unpressurized reservoir to continuously measure the bile flow, which was expressed as milliliters/3-hour reperfusion period.

Thiobarbituric acid reactive substances determination (TBARS)

The intensity of lipoperoxidation, as a result of oxidative stress produced by a reactive oxygen radical, was measured spectrophotometrically by concentration of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Wills, 1966.²⁷ TBARS results were expressed as nmol/mL. Blood samples were obtained from the venovenous shunt before ischemia, at the end of the ischemic period (at 75 minutes ischemia), 5, 15, 30, 60, 90 and 180 minutes after reperfusion.

Superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in serum samples by measuring the inhibition of the rate of auto-catalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2),²⁸ both from E. Merck. This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C during 3 minutes. Enzymatic activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein (U/g de protein). One unit is defined as the amount of enzymes that inhibit the rate of adrenochrome formation by 50%.

Catalase (CAT) activity

The assay was performed according to the method described by Aebi.²⁹ The assay principle is based on the determination of the rate of hydrogen peroxide (E. Merck) decomposition at 240 nm. This reaction was conducted at a constant temperature (30°C) for 1 minute. Enzymatic activity is expressed as catalase units per mg of protein (U/mg de protein). One unit of catalase decomposed 1 μ mole of H₂O₂ per min at pH 7.4 and 30°C.

Proteins

The total protein levels were analyzed by Biureto methods (Kit Proteínas Totais-Labtest Diagnostica S.A., Brazil), for spectrophotometrical determination in 545nm.

Histology and Immunohistochemistry Assessment

Liver biopsies were taken from each of the six animals in each group at 180 min after reperfusion for histological examination using light microscopy (Olympus BX 41, Japan). Light microscopy analysis was performed under hematoxylin and eosin (H&E) staining and we examined the mechanism by which ischemia/reperfusion influenced apoptosis after reperfusion using immunohistochemical methods (polyclonal anti-caspase-3 antibody) (D175, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA). A pathologist examined the slides without knowledge of the study groups.

Haematoxylin and Eosin (H&E): Biopsies were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Thin sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) for analysis of sinusoidal congestion, cytoplasmic vacuolation, infiltrating polymorphonuclear leukocytes (PMNs), steatosis and liver necrosis. Morphologic criteria for necrosis such as increased cytoplasmic eosinophilia, vacuolization, cell disruption, loss of architecture, and nuclear changes consisting in pycnosis, karyorrhexis, or karyolysis were used to determine necrosis.³⁰

The extent of sinusoidal congestion, cytoplasmic vacuolation, infiltrating polymorphonuclear leukocytes (PMNs), liver necrosis and steatosis was assessed semiquantitatively as follows: Sinusoidal congestion (score 0–3): none=0; mild (dilation of the centrilobular vein) = 1; moderate (dilation of the centrilobular vein plus sinusoidal dilation of zone 3) = 2; severe (dilation of the centrilobular vein + sinusoidal dilation of zone 3 and zone 2) = 3; Cytoplasmic vacuolation (score 0–3): none=0; mild (rare perivenular hepatocytes) = 1; moderate (numerous perivenular liver cells) = 2; severe (alteration of hepatocytes beyond zone 3) = 3; PMNs (score 0 - 4) none=0; rare cells = 1; focal = 2; multifocal = 3; diffuse and uniformly intense = 4; Liver necrosis (score 0–4): absence of necrosis = 0; spotty necrosis (scattered necrotic hepatocytes at zone 3) = 1; focal necrosis (periportal or perivenular or midacinar necrosis) = 2; multifocal necrosis (necrosis in more than one acinar zone) = 3; lobular necrosis (necrosis bridging between vascular inflow and outflow structures – diffuse, zones 1,2,3) = 4; and steatosis (score 0 – 3) <5% = 0; mild (33%) = 1; moderate (33% - 66%) = 2; severe (>66%) = 3.

Caspase-3 Activity Assay: Immunohistochemistry for cleaved caspase 3 was performed on pig liver tissue fixed in formalin and embedded in paraffin and removed from each group after 180 minutes of reperfusion. For immunohistochemistry preparation, 4 micrometer sections distributed on silanized slides were deparaffinized in xylene, hydrated in alcohol and pre-treated for antigen recovery in citric acid (pH 6.0) using a steamer at a temperature of 98oC for 20 minutes. The slides were incubated using cleaved anti-caspase-3 polyclonal antibody (D175, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) at a 1300 dilution, an anti-IgG biotinilated secondary antibody of rabbit at a 1320 dilution (BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), VECTASTAIN Elite ABC detection system kit (PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) and diaminobenzidine chromogen -DAB (D5637, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Positive (lymphoid tissue) and negative controls prove the reliability of the reaction.

Morphometric analysis of the cells in tissue stained by the anti-caspase-3 method was performed under high-power magnification (x400) (Olympus BX 41, Japan). Positively labeled nuclei (brown color) were identified from negatively unstained nuclei (blue color). The number of positive nuclei was determined by counting all the positively labeled nuclei present in twenty random visual fields for each anti-caspase-3 stained tissue sample under a microscope. The evaluation included the count of 10 portal spaces (one portal space per field, using the portal space as a central reference, prioritizing the septal region to increase the number of cells counted) and 10 centrolobular veins (one centrolobular vein per field, using as central reference the terminal centrolobular vein), which meant a total area of 360 mm² (18 mm²/field). The apoptotic cells had the following characteristics: single cells, no inflammation, curling of cell membrane, brown particulate or fragmented nuclei, as previously described.³¹ The numbers of hepatocytes and apoptotic sinusoidal lining cells (SLCs) were counted independently and scored semiquantitatively by averaging the number of apoptotic cells by the total area of fields analyzed. The cells that showed a brown color in the cytoplasm and the free positive cells inside the sinusoids (lymphocytes and PMNs) were not considered positive for the caspase-3 marker. The presence of areas of marked lymphocytic infiltration or necrosis were removed to count apoptotic cells, as also previously described.³²

Electron Microscopy (Ultrastructural assessment)

Liver biopsies were taken from each of the six animals in each group at 180 min after reperfusion for electron microscopy. Two observed examined the slides without knowledge of the study groups.

One mm³ fresh liver tissue was immediately placed in a fixing solution with 2% glutaraldehyde. The samples were post-fixed with 1% osmium tetroxide buffer, then followed by an “en bloc” contrast stage with 1% uranyl acetate. The dehydration was performed in a gradual alcohol series. The pre-soaking of the material was done in a mixture of Epon 812 with pure acetone at the following proportions: 75%, 50%, 25%. Soaking was performed with pure 812 Epon for 24

hours. Polymerization was carried out in an oven at constant 60° C for 72 hours. The semithin sections were cut on the Leica Ultracut UCT 2.0 ultramicrotome, using a diamond razor, with a thickness of 800 nm and stained with an aqueous solution of 1% toluidine blue + basic fuchsin. The ultrathin sections were cut with a 70 nm thickness on the same microtome, using a “Durkker type histo with trough 3mm” diamond razor. Ultrathin sections were stained with metanilic uranyl solution and then lead citrate.³³ The changes in ultrastructural organization were examined through an EM208S Philips transmission electron microscope (Philips Electronic Instruments Inc, Eindhoven, Holland) with an 80-kV acceleration voltage, at the Electron Microscopy Laboratory at Universidade Luterana do Brasil – ULBRA/RS.

Mitochondrial swelling: The ultrastructural modifications of the mitochondria were assessed to determine the presence of mitochondrial swelling and changes in the mitochondrial membrane. The mitochondrial swelling was assessed semiquantitatively by the mean of the measure of the area of 10 mitochondria close to the nucleus of each animal using Carnoy v. 2.0 software (<http://www.carnoy.org>) following the formula of the area of the ellipse $A=\pi ab$; where (a) is the large semidiameter, and (b) the small semi-diameter. The results were expressed in μm .

Statistical analysis

Considering that there was an interest in testing differences with magnitudes of effect equal to or larger than two standard deviation units ($E/S \geq 2$), it was estimated that with six (6) animals per group we would obtain a statistical power of approximately 90% at an $\alpha=0.05$ level of significance. The data were described by mean and standard deviation, and when the scale scores did not have much amplitude, the median and the minimum and maximum values were chosen. The evolution of the TBARS, SOD and CAT values was evaluated by a model of repeated measures analysis of variance. The other comparisons, involving specific moments, were assessed by one-way ANOVA, differences being found by Tukey test. The scores were Rank transformed prior to analysis and

comparisons were conducted via ANOVA followed by Tukey post hoc procedure. The level of significance adopted was $\alpha=0,05$, and the data were analysed using the SPSS version 12.0 and SigmaPlot version 8.0 program.³⁴

RESULTS

Liver Enzyme Analysis

Changes in serum aminotransferases after reperfusion of livers subjected to ischemia are summarized in Table 1. After 3 h of reperfusion, the serum AST and ALT levels in the sham-operated animals did not change during the time of the experiment. In non preconditioned group, the serum AST and ALT levels increased to approximately 15 and 2 times those observed in the sham group 3 h after reperfusion, respectively. These increases were significantly suppressed by the pharmacological preconditioning group (Figure 1).

Excretory Liver Function

After 180 minutes of reperfusion, bile production was almost completely stopped in the non-preconditioned group, (5.3 ± 3.3 ml) on the other hand, bile production in the preconditioned group (28.0 ± 5.6 ml) reached approximately 60% of the volume produced by the sham-operated group (49.3 ± 8.4 ml) (Table 1 - $P < 0.01$).

TBARS Levels and Antioxidant Enzyme Activity

The TBARS serum levels obtained were higher in the non-preconditioned compared to the two other groups in practically all the samples collected, but the values were not statistically different in any of the groups (Figure 2).

CAT activity also did not differ among the three groups in any of the samples, while SOD activity was significantly higher in the preconditioning group (4.70 ± 1.84) when compared with the non-preconditioning group (2.43 ± 1.03) and sham-operated group (1.88 ± 1.57) 60 minutes after reperfusion ($P = 0.04$).

Histological Findings

Light microscope evaluation of liver biopsies obtained at the end of 180 minutes of reperfusion showed only minor alterations in all groups. Steatosis was less than 5% in all groups ($p=0.39$), cytoplasmic vacuolation was present in rare perivenular hepatocytes ($p=0.24$) and, in all groups, liver necrosis was absent or only scattered necrotic hepatocytes were found ($p=0.32$). The sinusoidal congestion was more evident in the non-preconditioning than the preconditioning group and sham-operated group, although the difference was only significant with respect to the sham-operated group ($p=0.02$). The infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) observed in the sinusoids was statistically greater in the non-pre-conditioned group compared with the two other groups ($p=0.01$) (figure 3).

Caspase-3 Activity

Under light microscopy, anti-caspase-3 staining indicated that cell injury occurred primarily in the form of apoptosis at the early stage of reperfusion and apoptotic cells were found in the same proportion between centrolobular zones and the portal zone in each group ($p>0.05$). The apoptotic sinusoidal cell score was higher than the score of apoptotic hepatocytes, both in the centrolobular zone and in the portal zone in the two groups submitted to ischemia/reperfusion ($P<0.05$). The total score of apoptotic cells (centrolobular + portal zone) in the non-preconditioned group (39.0 ± 12.7) was significantly higher than in preconditioning (16.2 ± 11.7) and than in the sham-operated group (3.2 ± 2.9) ($P<0.01$) (Figure 4).

Livers subjected to ischemia and reperfusion without preconditioning showed approximately 2.5-fold greater caspase-3 activity when compared with the preconditioned group ($P<0.01$), on the other hand, the caspase-3 activity found in

the preconditioned group was greater than in the sham group, however the score found was not statistically different (Figure 5A, B, C).

Ultrastructural changes of mitochondria and quantitative analysis of swelling

In the sham-operated group, the mitochondrial structure was normal. Mitochondria were arranged in an orderly manner in a round or ellipsoid form, without swelling. The mitochondrial membrane was intact and clear. In both groups submitted to ischemia/reperfusion, the mitochondrial edema was observed, but the ultrastructural changes (mitochondrial membrane) were less intense in the preconditioned group (Figure 6A, B, C). The cross-sectional area of the mitochondria observed in this study were increased after reperfusion in non-preconditioning group ($0.6623 \pm 0.2241 \mu\text{m}$) against sham operated ($0.3391 \pm 0.0714 \mu\text{m}$) and preconditioning groups ($0.4077 \pm 0.0416 \mu\text{m}$), ($P < 0.01$) (Figure 7).

DISCUSSION

In the *in vivo* experimental model of hepatic ischemia/reperfusion injury in pigs used in this study, the intra-portal exogenous L-arginine infusion conferred strong resistance to liver cell damage consequent to prolonged warm ischemia followed by tissue reoxygenation. We demonstrated improved liver function and preserved parenchymal integrity as a protective effect of exogenous intraportal L-arginine infusion. We showed that the protective mechanisms underlying exogenous L-arginine infusion decreased the serum AST level, increased bile production and resulted in significant inhibition of sinusoidal endothelial cells and hepatocyte apoptosis. The caspase-3 activity, clearly visible soon after reperfusion, was prevented by the exogenous L-arginine infusion, and the damage to the mitochondrial structure was also attenuated.

A great number of pharmacological agents have been used to attenuate the ischemic and reperfusion injuries in the liver. These agents may both block the lesion pathways directly or submit the liver to pharmacological preconditioning, i.e., they induce a low level of stress in the liver cells, and these in turn begin a cell defense mechanism against a later, more aggressive insult.³⁵ Among these substances we can list antioxidants, protease inhibitors and anti-apoptotic molecules, adenosine agonists, NO donors or NO precursors (L-arginine), among others.^{26, 35}

The first hours of reperfusion are definitely characterized by low NO concentrations,^{6, 7, 12} and experimental models have demonstrated that maintaining nitric oxide levels during reperfusion by administering L-arginine attenuates the liver ischemia/reperfusion injuries; however, most of these studies used peripheral or peritoneal intravenous infusion.^{4, 6-14, 36}

The liver protection effects of L-arginine through intraportal infusion were clearly demonstrated in this study, but had no repercussion on the hemodynamic status of the animals. The significant reduction of AST levels measured 3 hours after

reperfusion reflected the beneficial effects of preconditioning treatment on this *in vivo* ischemia/reperfusion injury model, which was also found by other authors.^{6, 8, 12, 36, 37} The serum level of AST was distinctly elevated in both groups submitted to ischemia/reperfusion injury, in contrast to the level of ALT, which besides presenting much lower serum levels was significantly higher in the non-preconditioned group compared with the sham-operated group, but not different from the preconditioned group. It seems that the lag time for ALT release into the blood is longer than that of AST, as previously described.^{14, 32, 38}

Most clinical studies have used aminotransferase levels to assess hepatic injury resulting from ischemia.^{39, 40} These enzymes are currently the most sensitive markers of ischemic injury to the liver, however, serum enzyme concentrations cannot easily be used as surrogate markers (isolated markers) for the extent of irreversible damage in hepatic ischemia/reperfusion injury.⁴¹

Therefore, corroborating the reduction of serum AST levels, we also demonstrated a significant increase of bile production in the preconditioned group. Bile production, as a parameter of excretory liver function, has also been described as a valuable parameter of hepatic ischemia/reperfusion injury.⁴²

Bilirubin has been described as a potent physiological bile pigment with an antioxidant function that protects cells from oxidative injury.^{43, 44} In this study, bile production in the sham-operated group remained constant during the time of the experiment, but was almost completely interrupted in both groups during ischemia (data not shown), whereas during the 3-h reperfusion period, cumulative bile production remained severely depressed in the non-preconditioned group, and it recovered in the group preconditioned with L-arginine.

Maintaining serum NO levels during reperfusion by L-arginine administration has also demonstrated a protection effect by reduced oxidative stress and diminished lipid peroxidation.^{14, 32, 36, 37} In this study the serum levels obtained from TBARS were higher in the non-preconditioned group compared with the two other groups

in practically all the samples collected, but the values obtained were not statistically significant. On the other hand, we observed a significant elevation of SOD, 60 min after reperfusion in the group that was preconditioned with L-arginine, which suggests a protective effect of L-arginine by stimulation of this antioxidant system, as well as greater involvement of the superoxide radical as a reactive oxygen species mediating the cell injury, as also shown previously.³⁷

Despite the greater tendency to superoxide involvement in this group, the detoxification capacity of this reactive species by SOD appears to have been sufficient to avoid cell injury, since the TBARS serum levels were similar among groups and, on the other hand, we observed a better preservation of liver cells in the preconditioned group. The NO levels increased by L-arginine infusion can also inactivate the superoxide radical, this time offering additional protection against the endothelial cells or hepatocytes.^{32, 37} This mechanism may have helped detoxify the superoxide, but these data can only be inferred, since measuring the NO levels was not the subject of this study.

Although the damage of membranes by lipid peroxidation is one of the most popular hypotheses to explain injury by ROS, other mechanisms of reactive oxygen-induced cell injury appear to be more important, and the lipid peroxidation products may be involved in the amplification and continuation of the inflammatory response.⁴⁵

Jaeschke et al.⁴⁵ using different models of hepatic injury induction by lipid peroxidation in vivo, observed that, where lipid peroxidation was the cause of cell death, a wide variety of lipid peroxidation parameters, such as ethane and pentane exhalation, hepatic malondialdehyde content, hepatic levels of hydroxy and hydroperoxy fatty acids, and isoprostanes, consistently increased by 20- to 50-fold above baseline. On the other hand, in virtually all manuscripts on hepatic ischemia/reperfusion injury, including these results (through serum level), lipid peroxidation parameters increased less than threefold above baseline.^{45, 46} Thus, on a quantitative basis, we could also agree with Jaeschke et al.⁴⁵ when they say that it is very difficult to explain that the severe injury during reperfusion could be

caused by moderate lipid peroxidation. Lipid peroxidation in the hepatic ischemia/reperfusion injury is a major area for further investigation.

Hepatic ischaemia and reperfusion may induce not only metabolic impairment but also morphological alteration of the liver. In previous models of liver ischemia/reperfusion, morphological evidence of cell injury after prolonged ischemia followed by reperfusion was demonstrated by light and electron microscopy.^{14, 32, 47} In this study, histological and ultrastructural changes were more evident in the non-preconditioned group. Among the histological changes, we see that the non-preconditioned group presented significantly greater infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the sinusoids compared with the preconditioned group. This was previously demonstrated by others authors.^{4, 37}

Under electron microscopy analysis, in both groups submitted to ischemia/reperfusion, we observed changes in the mitochondria, but with greater intensity in the non-preconditioned group. The ischemia/reperfusion caused disruption of the mitochondrial structure characterized by swelling with loss of cristae, decrease of matrix density; further, some of this mitochondria showed blebs with rupture of the external membrane, as also shown previously.^{14,32}

Prior to this it had been considered that the apoptotic cells manifested condensed chromatin but intact mitochondria; now much more evidence revealed that significant changes in mitochondria such as swelling, megamitochondria, mitochondrial pyknosis and disrupted outer-membrane could take place in many apoptotic models.^{48, 49} Indeed, the mitochondria play a critical decision making role in the apoptotic cascade through control of the release of those factors that stimulate the late steps of apoptotic death.⁵⁰

These apoptogenic factors clearly include the electron-transport protein cytochrome-c⁵⁰⁻⁵² and may also include protease(s),⁵² including those of the

caspase family.⁵³ The mechanism for which there is the most supporting evidence for apoptogen release is by means of mitochondrial swelling that could be induced either by the permeability transition or by another permeability-altering event. As the permeability of the inner mitochondrial membrane is compromised, osmotic forces induce an increase in the matrix volume, ultimately rupturing the outer mitochondrial membrane.⁵⁰ The method used in this study to quantify mitochondrial swelling by measuring the area of the ellipse was simple, quick, and in accordance with the other results obtained in this study to quantify the liver cell injury. The data obtained in this study allow the assumption that the structural and functional changes of mitochondria were correlated with the initiation and development of cell apoptosis. However, the precise mechanisms underlying this pharmacological preconditioning, producing mitochondrial protection, remain unclear.

A few authors suggest that the target of cytoprotection associated with NO may include increased levels of cGMP after exposure of hepatocytes to NO stimulates cGMP-dependent protein kinase (PKG), which in turn blocks onset of the MPT and subsequent necrotic cell death.⁵⁴

Knowledge on molecules and pathways involved in apoptosis is just emerging. The quantitation of apoptosis in the tissue was mainly based on the TUNEL assay.^{14, 19, 32, 55} Actually, the most investigated signaling pathway is the caspase cascade, and caspase activation remains a hallmark feature of apoptosis.^{55, 56} In fact, a large body of evidence exists to support caspase 3 as a distal effector protease in apoptosis and in directly inducing apoptosis.⁵⁷ Studies have shown that NO has an anti-apoptotic effect, inhibiting the activity of proteases of the caspase family (caspases 3, 8 and 9),²³⁻²⁵ for prevention of cytochrome-c release,²³ among others. In the present study, using the anti-caspase-3 assay, we showed that the pharmacological preconditioning reduces the amount of cell apoptosis. In others words, the apoptotic cells were significantly increased in non-

preconditioning livers compared with preconditioned group (approximately 2.5-fold). Similar results were observed by other authors, but through quantification using the TUNEL method.^{14, 32} Furthermore, in the preconditioned group, caspase-3 activity was greater than in the sham group, but the score of apoptotic cells found between these two groups was not statistically different.

The chronology of cell death was not the main purpose of this study, but our data supported sinusoidal endothelial cell susceptibility to apoptosis. We showed that the score of apoptotic sinusoidal endothelial cells was significantly higher than apoptotic hepatocytes. A large part of the studies on the cold and warm ischemic liver suggested that the sinusoidal endothelial cell is the first cell type to undergo apoptosis after reperfusion.^{18, 58, 59} Despite this, on the contrary of these data, a few authors observed rare apoptotic sinusoidal cells after warm ischemia/reperfusion in pig livers.¹⁴ It has been described that the periportal areas are considered more ischemia-resistant than the centrolobular areas, where more severe hypoxia often causes necrosis. The same authors suggest that L-arginine may be more effective in the areas where the hepatocytes suffer mild damage and would still be able to recover from the injury.^{14, 32} Interestingly, the scores of apoptotic cells in the centrolobular and portal zones were similar in our study, also opposing data from the literature.^{14, 32}

On the other hand, these findings may be explained by the experimental model applied in this study (global liver ischemia), i.e., in no-flow ischemia, the entire liver or lobe becomes anoxic, whereas in low-flow hypoxia, pericentral (centrolobular) regions but not periportal regions of individual liver lobes become anoxic and subject to injury. Because of the dual blood supply of the liver, the pattern of pericentral necrosis due to low-flow hypoxia is most often encountered and is a frequent finding at autopsy.⁶⁰

This study was designed to observe the changes in the liver cells that occurred during the early phase of reperfusion (beginning of reperfusion up to the third or fourth hour), which may have underestimated a few results, especially as regards

the mode of cell death (apoptosis or necrosis), and the late effects of the L-arginine/NO pathway. Recently, apoptosis has been indicated as a major mode of cell death during hepatic warm ischemia/reperfusion injury by some authors,^{19, 59, 61} on the other hand, other reports concluded that the major mode of cell death during hepatic warm ischemia/reperfusion injury is necrosis rather than apoptosis.^{55, 62}

In this context, it seems that both forms of cell death coexist,^{3, 50, 63} or occur serially, depending on the nature and severity of the insult and on the condition of the affected cell.³ Previous studies, using models of normothermic hepatic ischemia have showed that both populations of hepatic cells undergo apoptosis after reperfusion with maximal injury observed 3 hours after reperfusion. This type of injury occurred well before any evidence of necrosis, which was apparent only 6 to 24 hours after surgery.^{18, 19, 58, 59} Helling et al.⁶⁴ recently demonstrated in a pig model that the detectable amount of apoptotic cells was doubled when reperfusion was prolonged from 60 min to 2 or 4 days. Makoto et al.⁶² in a pig model of long-term of ischemia (180 minutes) followed by reperfusion concluded that the major mode of cell death during hepatic warm ischemia/reperfusion injury was necrosis, and apoptosis was not dominant. The peak phase of apoptosis was 6 hours after reperfusion and decreased gradually thereafter. Conversely, necrosis appeared from 9 hr after reperfusion and increased gradually to 24 hr after reperfusion. Schulz et al.⁴¹ in another pig model of long-term of ischemia (120 min) followed by 480 min of reperfusion preceded by ischemic preconditioning demonstrated that less than 1% of hepatocytes were necrotic or apoptotic.

Similarly, in the present study necrosis was absent or only scattered necrotic hepatocytes were found in all groups, on the other hand, apoptotic cells were dominant after 90 min of ischemia followed by 180 min of reperfusion. Such results could be explained mainly by the actual difference in the length of reperfusion and not due to duration of ischemia *per se*. Therefore, although our data further suggest that apoptosis is a key modality of cell death in the early postischemic liver, the absolute number of apoptotic cells and the amount of

necrotic cells might have been underestimated due to limited reperfusion period of 180 min in this study.

Although the NO levels were not determined directly or indirectly in this study, we believe that the intraportal administration of L-arginine increased NO production during the early phase of reperfusion, without causing any damage to the liver, which was demonstrated by the hepatoprotective effects observed in this experimental model. Peroxynitrite, a highly reactive species generated when excess NO reacts with superoxide,^{15, 16} does not appear to have been involved dangerously in this experiment. This hypothesis is based on the beneficial results of this study and on previous studies showing that, even with high dose blood infusions (100 mg/kg – 600 mg/kg) of L-arginine, relatively low quantities of NO were produced during the early phase of reperfusion.^{7, 12, 37, 65}

The experimental model chosen is justified by the fact that, in pigs, on the contrary of rats, hepatic tolerance to prolonged normothermic ischemia is similar to that in humans. Therefore, large animals such as pigs (used in this study) show greater similarity in their physiology and anatomy to human beings and are thus more suited for the study of problems of direct clinical relevance.⁶⁶ The limited number of animals studied (6 per group) is one of the main limitations of this study, and we believe that our data may have failed to find a statistically significant difference in moderate and small-sized effects; on the other hand, the statistically significant differences found in this study may safely be accepted.

Another possible limitation of this study may have been the method used to determine the lipid peroxidation (serum concentration of TBARS), which did not show oxidative stress as the most important component of tissue injury, against the results of the liver tests used in this study, and the morphological evaluation of the liver cells clearly showed the protection of preconditioning.

Burra et al.³² in an experimental model of ischemia and reperfusion in pigs, assessing the protective effects of L-arginine by intravenous infusion also did not observe a difference in the serum concentration of TBARS compared with the

control group (ischemia and reperfusion only). On the other hand, the group treated with L-arginine demonstrated protective effects on lipid peroxidation of tissues (liver) and on liver morphology. This and other studies using pharmacological preconditioning with L-arginine have demonstrated the non-correlation between the tissue levels (significantly lower than those of the controls) and serum levels of malondialdehyde.^{14, 32}

Moreover, studies on ischemic preconditioning have demonstrated concordant results between the concentration of malondialdehyde and the activity of SOD and CAT in liver tissue with the results found in the function tests and hepatocellular morphological evaluation.⁶⁷ Therefore, the correlation between the serum and tissue levels of the lipid peroxidation parameters and of the CAT, SOD enzymatic antioxidant systems is an important field for future investigation.

The beneficial effects of pharmacological preconditioning with the infusion of intraportal L-arginine were clearly demonstrated during the early phase of reperfusion in this experimental model. These data support the idea that strategies to prevent or reduce ischemic and warm reperfusion hepatic injuries through stimulating liver NO production are feasible and promising, but still a field for future investigation.

The precise mechanisms of the protective effect of exogenous L-arginine on the liver tissue are still unknown, but might occur through a much better preserved mitochondrial structure. The true potential of applying L-arginine in clinical situations must be proved through clinical studies in humans.

Table 1 – Effects of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine on the serum levels of aspartate aminotransferase, alanine amonotransferase and bile production..

Characteristic	Control group n=6 ($\bar{X} \pm SD$)	IR group n=6 ($\bar{X} \pm SD$)	L-a+IR group n=6 ($\bar{X} \pm SD$)	P
AST pre-ischemic (UI/L)	37.7±14.6	32.3±14.9	37.5±13.5	0.77
AST 180 min of reperfusion (UI/L)	46.2±23.7 ^(a)	702.2±118.1 ^(c)	363.3±115.7 ^(b)	<0.01
ALT pre-ischemic (UI/L)	31.3±4.4	23.7±7.9	25.7±9.3	0.22
ALT 180 min of reperfusion (UI/L)	27.0±6.9 ^(a)	57.2±17.5 ^(b)	36.8±16.3 ^{(a)(b)}	0.01
Bile production (mL/180min of reperfusion)	49.3±8.4 ^(c)	5.3±3.3 ^(a)	28.0±5.6 ^(b)	<0.01

$\bar{X} \pm SD$: mean value \pm standard deviation; ANOVA followed by Tukey test; P<0.05

Non-coinciding index-letters represent statistically significant differences in the post—hoc.

Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intraportal infusion of L-arginine 400 mg/kg; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

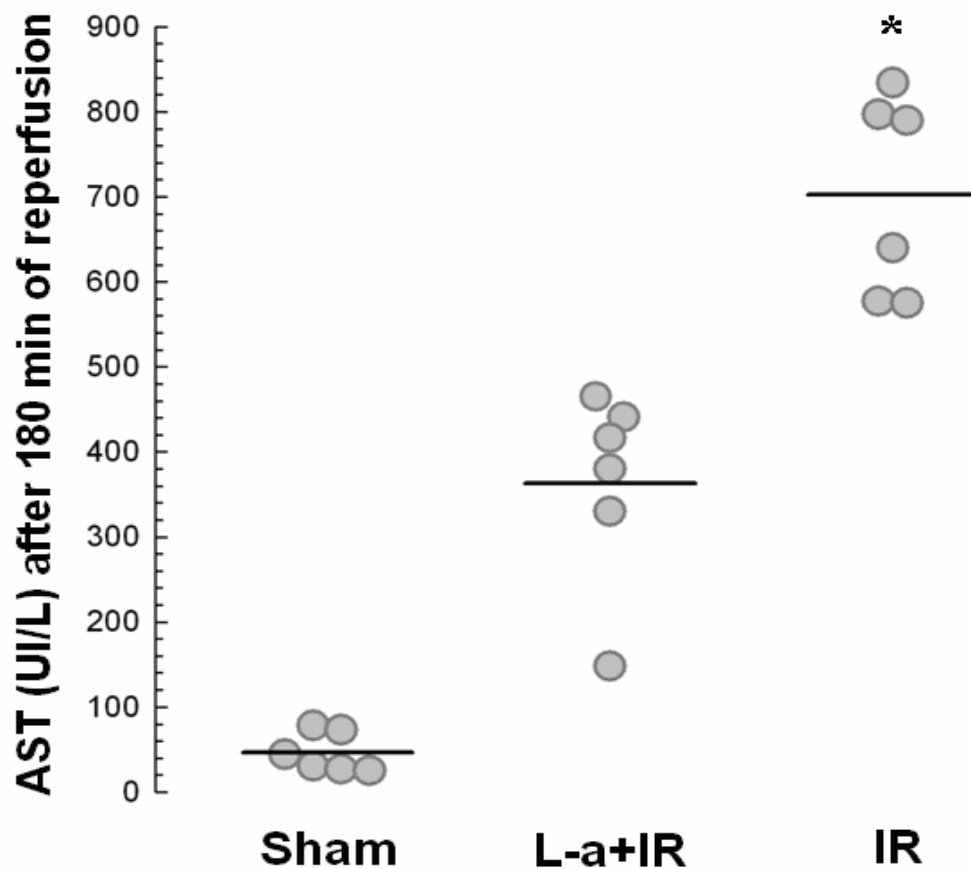


Figure 1 – Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. *The AST levels were higher in the IR group, compared with the L-a+IR group and compared with the control group ($p < 0.01$). Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intraportal infusion of L-arginine 400 mg/kg; AST: aspartate aminotransferase; ANOVA followed by Tukey test; $P < 0.05$.

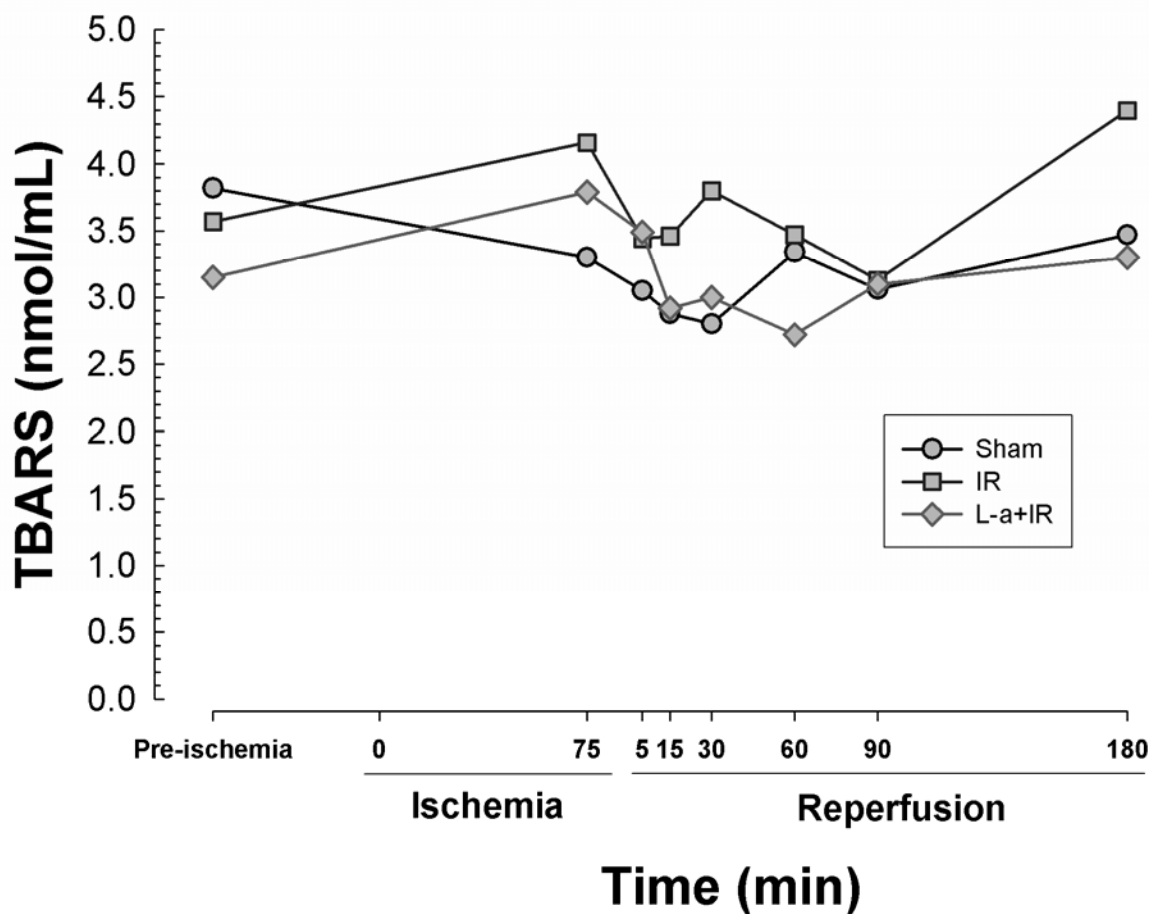


Figure 2 – Serum level (mean) of thiorbarbituric acid reactive substances (TBARS) in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. The values were not statistically significant at any of the times among the groups ($P>0.05$). Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intraportal infusion of L-arginine 400 mg/kg; AST: aspartate aminotransferase; Analysis of variance of repeated measures; $P<0.05$.

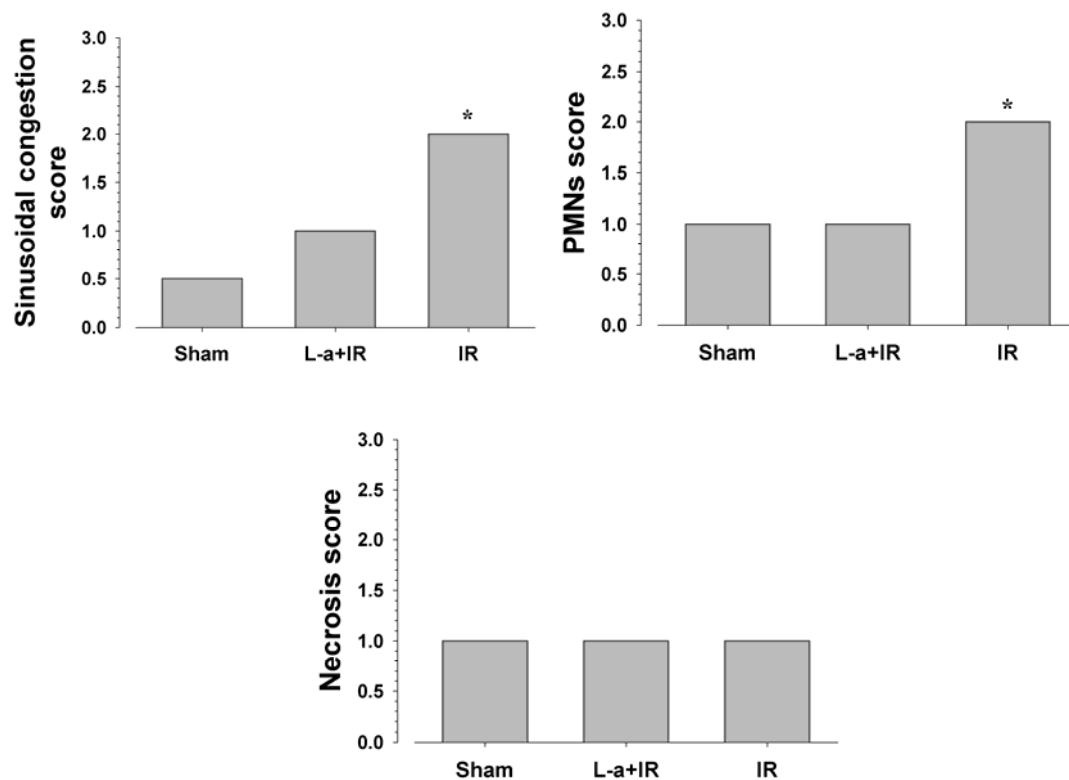


Figure 3 – Hepatic injury score (median) assessed by optical microscopy in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. *Sinusoidal congestion was significantly greater in the IR group versus control group ($P=0.02$). *Polymorphonuclear (PMNs) infiltration was significantly higher in the IR group versus the control group ($P=0.01$) and versus L-a+IR group ($P=0.01$). Necrosis was not different among the three groups ($P=0.24$). Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intra-portal infusion of L-arginine 400 mg/kg; The scores were Rank transformed prior to analysis and comparisons were conducted via ANOVA followed by Tukey post hoc procedure; $P<0.05$.

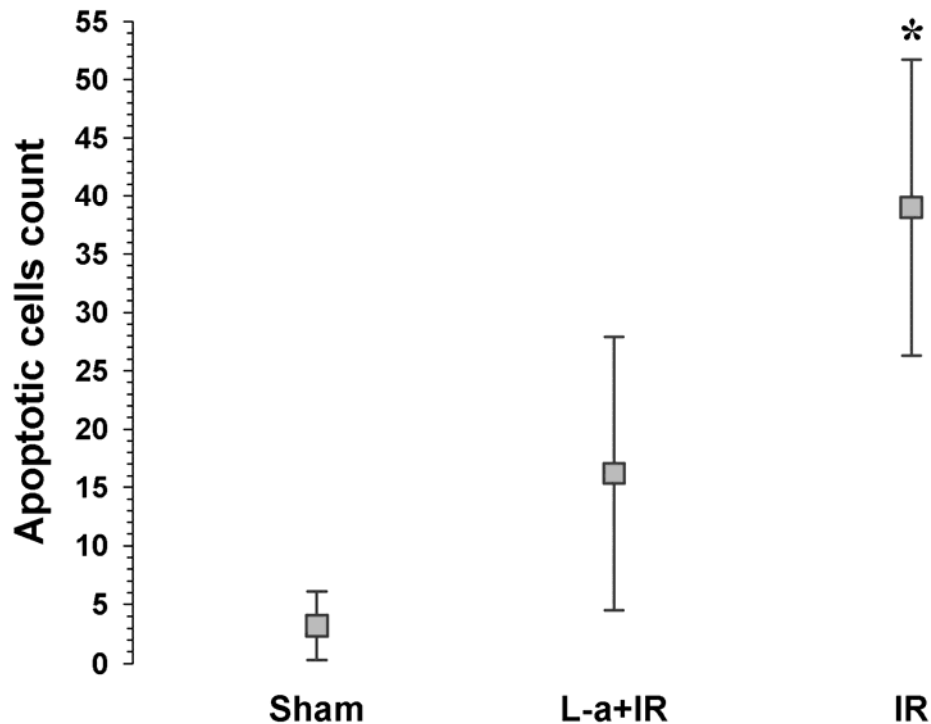


Figure 4 – Total score of apoptotic cells (hepatocytes+sinusoidal cells), assessed by the immunohistochemical technique, using the cleaved, polyclonal anticaspase-3 antibody (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, USA) under an optical microscope, in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. *The total score of apoptotic cells in the IR group (39.0 ± 12.7), was significantly higher than in the L-a+IR group (16.2 ± 11.7) and than the one found in the control group (3.2 ± 2.9) ($P < 0.01$). Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intra-portal infusion of L-arginine 400 mg/kg; Data are presented as mean \pm SD. ANOVA followed by Tukey test; $P < 0.05$.

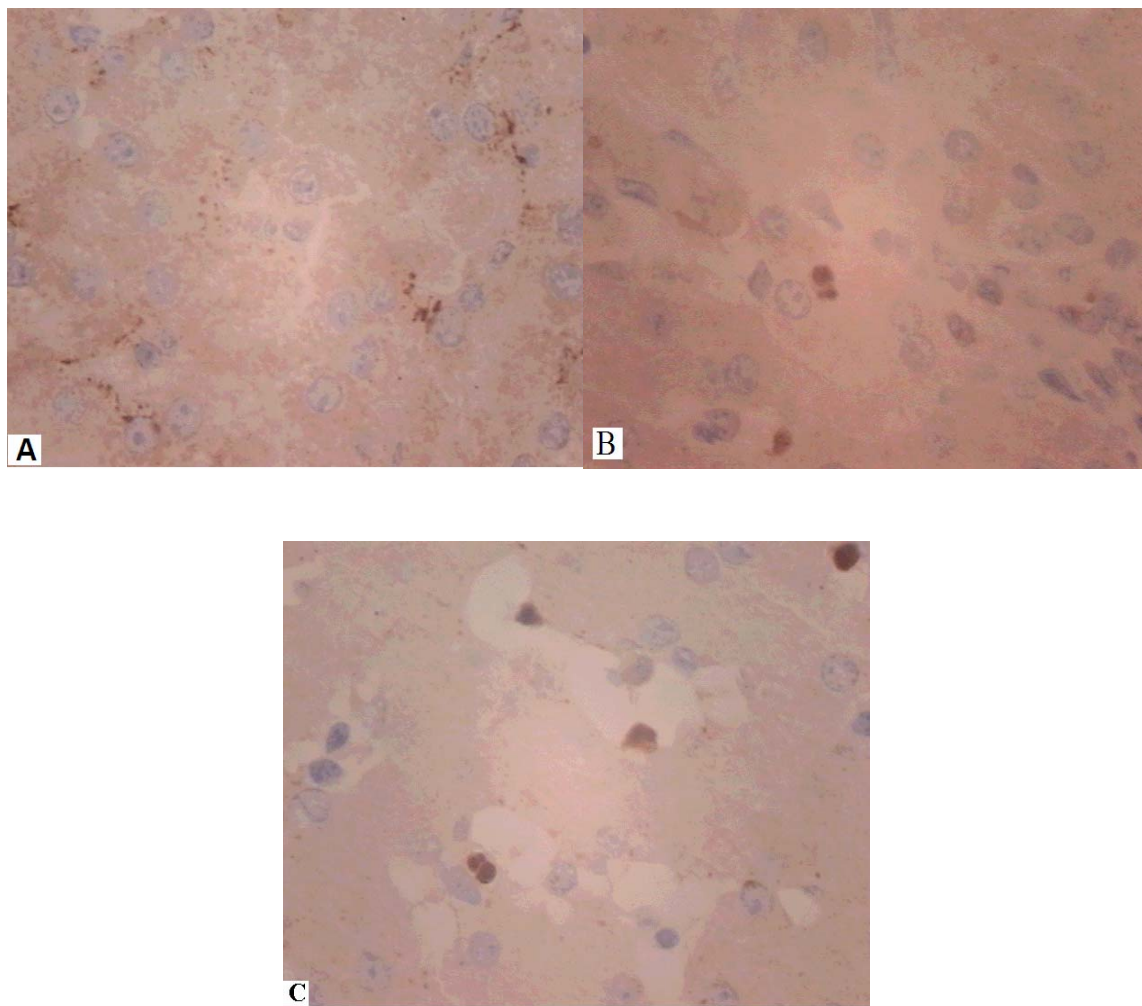
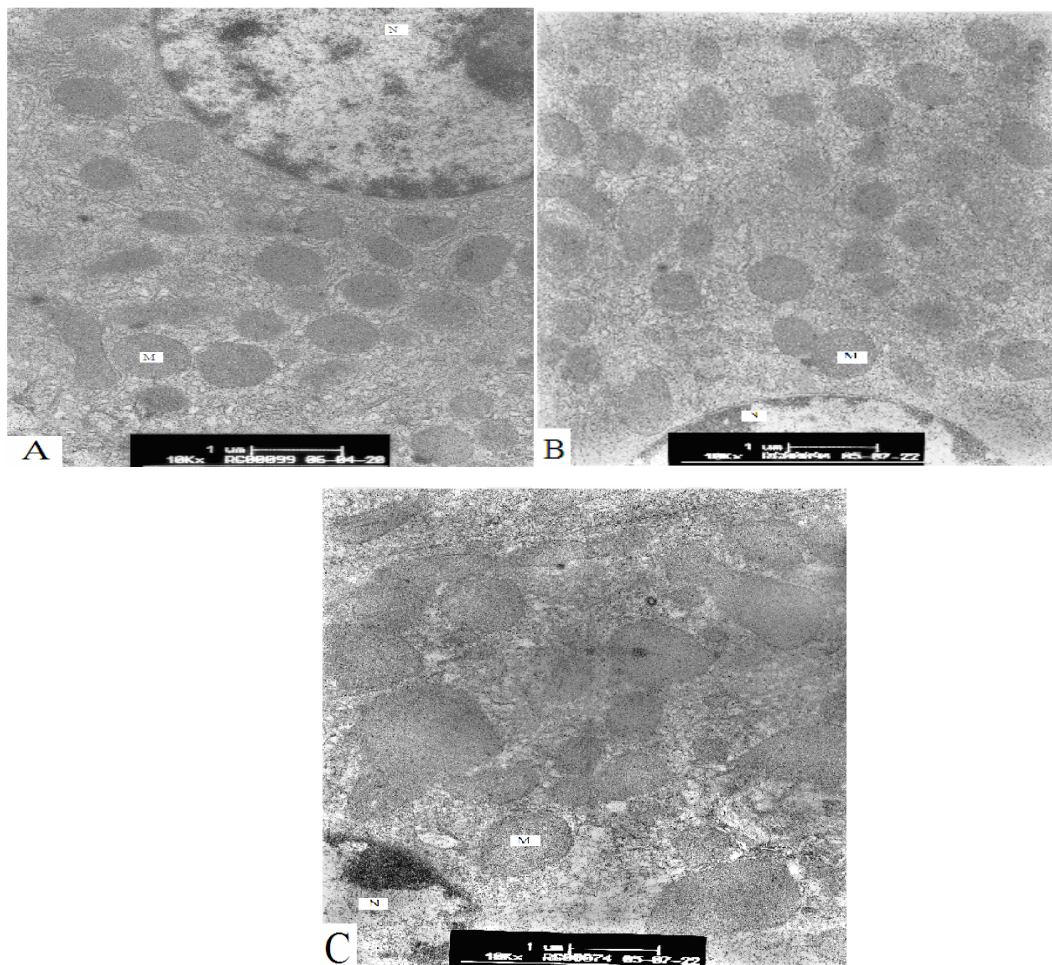


Figure 5A, B, C – Immunohistochemistry showing sample of hepatic tissue stained with the cleaved polyclonal anticaspase-3 antibody (D175, *Cell Signaling*, Danvers, MA, USA) under an optical microscope (400x magnification) in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. A) control group, hepatocytes and sinusoidal cells do not show caspase-3 activity; B) L-a+IR group, a few hepatocytes and apoptotic sinusoidal cells. C) IR group, several hepatocytes and apoptotic sinusoidal cells. Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intra-portal infusion of L-arginine 400 mg/kg.



Figures 6A, B, C – Representative photos of the mitochondrial structure of samples of hepatic tissue under electron microscopy (x10000 magnification) in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. A) control group, normal mitochondrial structure; B) L-a+IR group, slightly swollen mitochondria, visible mitochondrial membrane; C) IR group, deformed swollen mitochondria, mitochondrial membrane not clearly visible, a few partly ruptured, difficulty in viewing the crestaee and presence of large quantity of vacuoles in the cytoplasm. Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intraportal infusion of L-arginine 400 mg/kg.

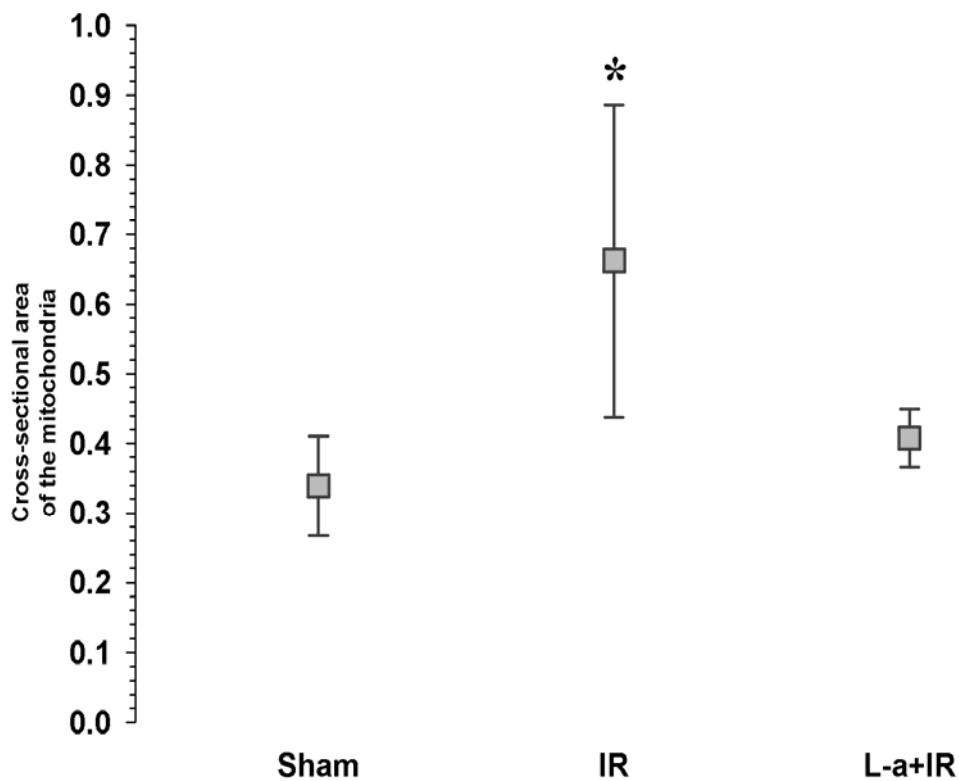


Figure 7 – Mitochondrial swelling calculated by the mean of the area of 10 mitochondria close to the nucleus, in a model of hepatic ischemia/reperfusion on pigs treated or not with the infusion of intraportal L-arginine. *The area of the mitochondria was statistically larger in the IR group ($0.6623 \pm 0.2241 \mu\text{m}$) compared with the control group ($0.3391 \pm 0.0714 \mu\text{m}$) and compared with the L-a+IR group ($0.4077 \pm 0.0416 \mu\text{m}$) ($P < 0.01$). Control group: *Sham operation*; IR group: ischemia for 90 minutes followed by reperfusion for 180 minutes; L-a + IR group: 10 minutes before the 90 minutes ischemia and 180 min of reperfusion, the liver was subjected to a pharmacological preconditioning protocol, i.e., intraportal infusion of L-arginine 400 mg/kg; Data are presented as mean \pm SD. ANOVA followed by Tukey test; $P < 0.05$.

REFERENCES

1. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;**20**(5): 383-396.
2. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *Faseb J* 2005;**19**(9): 1155-1157.
3. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 149-159.
4. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Rodes J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;**71**(4): 529-536.
5. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003;**9**(1): 1-11.
6. Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002;**36**(3): 573-581.
7. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998;**66**(5): 579-585.
8. Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;**29**(3): 809-813.
9. Geller DA, Chia SH, Takahashi Y, Yagnik GP, Tsoulfas G, Murase N. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;**25**(3): 142-147.

10. Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997;**27**(1): 163-169.
11. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;**59**(6): 772-779.
12. Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, Okuhama Y, Kusano T, Muto Y. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;**69**(2): 429-434.
13. Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Calabrese F, Pettenazzo E, Sarzo G, Parnigotto A, Bacelle L, Rigotti P. Protective effect of L-arginine on liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1997;**29**(1-2): 393-394.
14. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997;**183**(4): 477-485.
15. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;**268**(5 Pt 1): L699-722.
16. Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995;**108**(2): 603-605.
17. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;**271**(5 Pt 1): C1424-1437.
18. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999;**68**(1): 89-96.
19. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;**67**(8): 1099-1105.

20. Ishigami F, Naka S, Takeshita K, Kurumi Y, Hanasawa K, Tani T. Bile salt tauroursodeoxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;**72**(11): 1803-1807.
21. Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999;**276**(5 Pt 1): G1069-1073.
22. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**282**(5): 1075-1079.
23. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000;**32**(4 Pt 1): 770-778.
24. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res* 2002;**62**(6): 1648-1653.
25. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999;**284**(5414): 651-654.
26. Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006;**79**(20): 1881-1894.
27. Wills ED. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 1966;**99**(3): 667-676.
28. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;**32**: 279-312.
29. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;**105**: 121-126.
30. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent

mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002;**8**(11): 990-999.

31. Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;**10**(13): 1934-1938.

32. Burra P, Chirizzi L, Cardin R, Cadrobbi R, Baldan N, Calabrese F, Pettenazzo E, Calo L, Plebani M, Rigotti P. Warm hepatic ischemia in pigs: effects of L-arginine and oligotide treatment. *J Invest Surg* 2001;**14**(6): 303-312.

33. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;**17**: 208-212.

34. Altman DG. Statistics in medical journals: developments in the 1980s. *Stat Med* 1991;**10**(12): 1897-1913.

35. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;**32**(6): 1280-1288.

36. Lanteri R, Acquaviva R, Di Giacomo C, Caltabiano R, Li Destri G, Vanella L, Santangelo M, Lanzafame S, Di Cataldo A. Heme oxygenase 1 expression in postischemic reperfusion liver damage: effect of L-arginine. *Microsurgery* 2006;**26**(1): 25-32.

37. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, Furukawa H, Starzl TE, Todo S. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999;**188**(1): 43-52.

38. van Wagenveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, Gouma DJ. Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 376-384.

39. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 369-375.

40. Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997;**226**(6): 704-711; discussion 711-703.
41. Schulz R, Walz MK, Behrends M, Neumann T, Gerken G, Heusch G. Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**(1): H198-207.
42. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987;**42**(5): 565-569.
43. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;**4**(5): 749-758.
44. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;**235**(4792): 1043-1046.
45. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003;**16**(3): 127-140.
46. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;**15**(7): 718-724.
47. Man K, Lo CM, Liu CL, Zhang ZW, Lee TK, Ng IO, Fan ST, Wong J. Effects of the intermittent Pringle manoeuvre on hepatic gene expression and ultrastructure in a randomized clinical study. *Br J Surg* 2003;**90**(2): 183-189.
48. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000;**25**(7): 319-324.
49. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 1999;**46**(2): 223-237.
50. Murphy A. Potential Mechanisms of Mitochondrial Cytochrome-c Release During Apoptosis. *Drug dev res* 1999:18-25.

51. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;**275**(5303): 1132-1136.
52. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;**183**(4): 1533-1544.
53. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 1998;**140**(6): 1485-1495.
54. Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2004;**39**(6): 1533-1543.
55. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;**33**(2): 397-405.
56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;**281**(5381): 1312-1316.
57. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;**9**(1): 35-49.
58. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;**30**(5): 1223-1231.
59. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(6): 1652-1660.
60. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;**43**(2 Suppl 1): S31-44.
61. Soeda J, Miyagawa S, Sano K, Masumoto J, Taniguchi S, Kawasaki S. Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during

warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;**281**(4): G1115-1123.

62. Kimura H, Katsuramaki T, Isobe M, Nagayama M, Meguro M, Kukita K, Nui A, Hirata K. Role of inducible nitric oxide synthase in pig liver transplantation. *J Surg Res* 2003;**111**(1): 28-37.

63. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;**276**(1 Pt 1): G1-6.

64. Helling TS, Edwards CA, Helling TS, Jr., Chang CC, Hodges MC, Dhar A, VanWay C. Hepatic apoptotic activity following transient normothermic inflow occlusion and reperfusion in the swine model. *J Surg Res* 1999;**86**(1): 70-78.

65. Higa T, Shiraishi M, Mamadi T, Taira K, Oshiro T, Nozato E, Nagahama M, Muto Y. Limitations of exogenous L-arginine in exerting a cytoprotective effect on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surg Today* 2000;**30**(4): 352-359.

66. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg* 2006;**19**(2): 113-123.

67. Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock* 2005;**24**(4): 370-375.

9. CONCLUSÕES

Os efeitos benéficos do condicionamento isquêmico (10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusão) e do condicionamento farmacológico com a infusão *in bolus* de L-arginina intraportal (400mg/kg 10 minutos antes da isquemia prolongada), foram demonstrados durante a fase precoce da reperfusão, nesse modelo experimental de isquemia e reperfusão normotérmica (90 minutos de isquemia seguidos de 180 minutos de reperfusão) em fígado de suínos.

O condicionamento isquêmico e o condicionamento farmacológico com infusão intraportal de L-arginina deram suporte para as células hepáticas resistirem a um prolongado período de isquemia, bem como para resistirem ao período de reoxigenação.

Por meio deste estudo, demonstrou-se uma melhor função e uma melhor preservação das células hepáticas, como efeito protetor desses dois condicionamentos.

Os mecanismos de proteção, tanto do condicionamento isquêmico quanto do condicionamento farmacológico, resultaram em um significativo aumento na produção de bile e menor elevação sérica da aspartato aminotransferase (AST).

A repercussão nos parâmetros de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) e na atividade dos sistemas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), determinadas mediante concentrações séricas dos mesmos, não demonstrou alterações consistentes com a lesão tecidual nesse modelo experimental.

A avaliação das amostras hepáticas pela microscopia óptica (H&E), obtida no final dos 180 minutos de reperfusão, demonstrou apenas alterações de menor magnitude em todos os grupos submetidos à isquemia e reperfusão hepática. A congestão sinusoidal e a infiltração dos polimorfonucleares (PMNs) nos sinusóides, foram as alterações mais visivelmente encontradas no grupo submetido a isquemia e reperfusão, sem condicionamento isquêmico ou farmacológico. A necrose foi um achado pouco freqüente em todos os grupos.

Por meio da verificação da atividade da caspase 3, observamos que, tanto o condicionamento isquêmico, quanto o condicionamento farmacológico, resultaram em uma significativa redução da apoptose das células sinusoidais e dos hepatócitos, em comparação com o grupo não condicionado.

A lesão da ultra-estrutura mitocondrial (determinada pela medida da área das mitocôndrias) nas células hepáticas, claramente evidente no grupo não condicionado, foram prevenidas pela utilização de ambos os condicionamentos, de forma semelhante.

Portanto, nesse modelo experimental, a apoptose foi uma característica marcante das células hepáticas na fase precoce da lesão de isquemia e reperfusão, além disso, tanto o condicionamento isquêmico quanto o condicionamento farmacológico com L-arginina intraportal foram associados a uma melhor preservação da ultra-estrutura mitocondrial e a uma inibição da atividade da caspase 3.

Esses dados sugerem a mitocôndria como via sinalizadora comum de morte celular, que, como referido por outros autores, parece utilizar diferentes tipos de proteínas mitocondriais para ativar diversas vias de morte celular.¹ O melhor entendimento da estimulação específica dessas vias pode direcionar para a identificação de novos agentes terapêuticos eficazes na redução desses estímulos nocivos, bem como futuras áreas de investigação podem identificar

eventos celulares e/ou métodos responsáveis para manter estável a estrutura mitocondrial, particularmente a transição da permeabilidade mitocondrial.

O potencial de aplicabilidade de estratégias, tanto farmacológicas quanto cirúrgicas, observadas em modelos experimentais, certamente é um campo interessante e promissor. Entretanto, novas pesquisas, o desenvolvimento de drogas e estudos clínicos em humanos necessitam ser realizados, para se obter e avaliar agentes seguros, com efeito específico e eficazes para o uso rotineiro em situações clínicas.

1. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;**43**(2 Suppl 1): S31-44.

10. ANEXOS

10.1 Tabelas

10.1.1 Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis Peso, AST, ALT e Produção de bile.

Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal), nos níveis séricos da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e na produção de bile.

Característica	Grupo Controle n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo PCI+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo L-a+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	P
Peso, Kg	20,0±1,4	20,0±1,4	20,8±1,4	20,7±1,4	0,69
AST pré-isquemia, UI/L	37,7±14,6	32,3±14,9	39,2±13,0	37,5±13,5	0,85
AST 180 min reperfusão, UI/L	46,2±23,7 ^a	702,2±118,1 ^c	431,3±122,0 ^b	363,3±115,7 ^b	<0,01
ALT pré-isquemia, UI/L	31,3±4,4	23,7±7,9	31,3±6,9	25,7±9,3	0,2
ALT 180 min reperfusão, UI/L	27,0±6,9 ^a	57,2±17,5 ^b	59,2±25,4 ^b	36,8±16,3 ^{a,b}	0,01
Produção de bile, mL/180min	49,3±8,4 ^c	5,3±3,3 ^a	21,2±6,9 ^b	28,0±5,6 ^b	<0,01

$\bar{X} \pm DP$: média±desvio padrão; ANOVA seguido pelo teste de Tukey; P<0,05

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa ao teste de *post-hoc*; Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

10.1.2 Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal), nos níveis séricos do TBARS, SOD e CAT.

Característica	Grupo Controle n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo PCI+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo L-a+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	P
TBARS					
Pré-isquemia	3,82±0,80	3,57±1,36	3,80±0,60	3,15±0,50	0,54
75 min de isquemia	3,30±0,75	4,16±1,65	3,47±0,68	3,79±0,68	0,5
5 min na reperfusão	3,05±0,74	3,44±1,37	2,92±0,52	3,49±1,32	0,73
15 min na reperfusão	2,88±0,91	3,46±1,38	3,39±0,60	2,92±0,45	0,58
30 min na reperfusão	2,80±0,99	3,80±1,14	2,73±0,70	3,00±0,92	0,21
60 min na reperfusão	3,34±0,80	3,47±1,80	3,02±0,70	2,72±0,70	0,65
90 min na reperfusão	3,06±1,22	3,13±1,62	3,22±0,18	3,10±0,70	0,99
180 min na reperfusão	3,47±0,81 ^{a,b}	4,40±1,25 ^b	3,01±0,39 ^a	3,30±0,70 ^{a,b}	0,05
SOD					
Pré-isquemia	1,58±1,53	1,40±1,13	1,19±0,86	1,53±1,5	0,96
75 min de isquemia	1,78±1,63	1,92±0,91	0,62±2,73	1,60±1,72	0,32
5 min na reperfusão	2,72±2,61	1,74±1,92	2,05±2,6	2,61±2,36	0,89
15 min na reperfusão	2,33±1,70	3,54±2,23	3,43±2,16	3,48±2,01	0,7
30 min na reperfusão	1,80±2,03	2,32±1,52	1,68±1,35	3,62±1,0	0,14
60 min na reperfusão	1,88±1,57 ^a	2,43±1,03 ^{a,b}	2,0±1,43 ^a	4,70±1,84 ^b	0,04
90 min na reperfusão	3,0±2,63	3,21±2,86	2,70±1,70	2,90±0,94	0,98
180 min na reperfusão	3,20±2,14	2,02±3,34	2,40±1,10	2,70±1,24	0,7
CAT					
Pré-isquemia	0,60±0,41 ^a	1,95±1,31 ^b	1,23±0,80 ^{a,b}	0,30±0,25 ^a	<0,01
75 min de isquemia	1,10±0,72	1,0±0,83	1,02±0,80	0,80±0,62	0,91
5 min na reperfusão	1,14±1,0	2,10±1,20	1,64±1,0	1,23±1,40	0,47
15 min na reperfusão	1,04±0,83	1,70±1,0	1,67±0,90	2,50±2,32	0,39
30 min na reperfusão	0,74±0,60	1,11±0,70	1,95±0,80	1,80±1,50	0,12
60 min na reperfusão	1,20±0,72 ^a	1,02±0,83 ^a	4,01±2,73 ^b	1,60±1,80 ^{a,b}	0,02
90 min na reperfusão	0,80±0,60	1,40±0,90	3,50±2,24	1,91±2,54	0,08
180 min na reperfusão	1,10±1,40 ^a	1,0±0,44 ^a	4,40±1,80 ^b	1,43±1,13 ^a	<0,01

$\bar{X} \pm DP$: média±desvio padrão; Análise de variância de medidas repetidas; P<0,05. Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa ao teste de *post-hoc*; Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase.

10.1.3 Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis Congestão sinusoidal, Degeneração balonizante, Necrose, Infiltração de Polimorfonucleares e Esteatose.

Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal), na congestão sinusoidal, degeneração balonizante, necrose, infiltração de polimorfonucleares e esteatose determinadas pela microscopia óptica.

Característica	Grupo Controle n=6	Grupo IR n=6	Grupo PCI+IR n=6	Grupo L-a+IR n=6	P
Microscopia óptica					
Congestão sinusoidal	0,5 (0 a 1) ^a	2 (1 a 3) ^b	1 (0 a 2) ^{a,b}	1 (1 a 2) ^{a,b}	0,02
Degeneração balonizante	1 (1 a 2)	1 (0 a 3)	1 (0 a 2)	0,5 (0 a 1)	0,24
Necrose	1 (1 a 2)	1 (1 a 1)	1 (0 a 1)	1 (0 a 1)	0,32
PMNs	1 (1 a 2) ^a	2 (2 a 2) ^b	1,5 (1 a 2) ^{a,b}	1 (0 a 2) ^a	0,01
Esteatose	0 (0 a 0)	0 (0 a 0)	0 (0 a 0)	0 (0 a 1)	0,39

Dados são apresentados em mediana (valores mínimo e máximo); Os escores foram ordenados em postos (*Rank*) e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey; $P < 0,05$. Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa ao teste de *post-hoc*; Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão;; PMNs: polimorfonucleares; ZCL: zona centro lobular; ZP: zona portal.

10.1.4 Comparação dos quatro grupos experimentais quanto às variáveis Apoptose e Área das Mitocôndrias pela Microscopia Eletrônica.

Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na apoptose determinada através da atividade da caspase 3 (microscopia ótica), e na área das mitocôndrias (microscopia eletrônica).

Característica	Grupo Controle n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo PCI+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	Grupo L-a+IR n=6 ($\bar{X} \pm DP$)	P
Microscopia óptica					
Atividade da Caspase 3					
Total	3,2±2,9 ^a	39±12,7 ^b	12±10,1 ^a	16,2±11,7 ^a	<0,01
ZCL total	1,8±1,5 ^a	21,8±7,7 ^b	6,3±5,7 ^a	6,3±4,1 ^a	<0,01
ZP total	1,5±1,6 ^a	17,2±8,0 ^b	5,7±4,9 ^a	9,8±7,7 ^{a,b}	<0,01
ZCL endothelial	0,3±0,8	1,3±1,6	0,3±9,5	1,2±1,2	0,28
ZCL hepatócitos	0,7±0,8 ^a	5,7±1,8 ^b	2±2,2 ^a	1,8±2,3 ^a	<0,01
ZCL células sinusoidais	0,8±1,0 ^a	14,8±6,7 ^b	4,0±3,6 ^a	4,8±3,3 ^a	<0,01
ZP hepatócitos	0,7±1,0 ^a	4,7±3,8 ^b	1,0±1,5 ^{a,b}	2,2±1,9 ^{a,b}	0,03
ZP células sinusoidais	0,8±0,8 ^a	12,5±5,5 ^b	4,7±3,7 ^a	7,7±6,4 ^{a,b}	<0,01
Microscopia eletrônica					
Mitocôndrias					
Área média (10 mitocôndrias por animal/grupo)	0,3391± 0,7145 ^a	0,6623± 0,2241 ^b	0,4493± 0,1456 ^a	0,4077± 0,0416 ^a	<0,01

$\bar{X} \pm DP$: média±desvio padrão; ANOVA seguido pelo teste de Tukey; P<0,05

Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa ao teste de *post-hoc*; Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; ZCL: zona centro lobular; ZP: zona portal.

10.1.5 Comparação da Atividade da Caspase-3 entre Zonas Centrolobular / Zona Portal e Células Hepáticas.

Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na apoptose determinada através da atividade da caspase 3 (microscopia ótica) em relação às zonas centrolobular e zona portal.

Apoptose – Atividade da Caspase 3	ZCL ($\bar{X} \pm DP$)	ZP ($\bar{X} \pm DP$)	P
CONTROLE	1,8±1,5	1,5±1,6	>0,05
IR	21,8±7,7	17,2±8,0	>0,05
PCI+IR	6,3±5,7	5,7±4,9	>0,05
L-a+IR	6,3±4,1	9,8±7,7	0,08

Apoptose – Atividade da Caspase 3	ZCL hepatócitos ($\bar{X} \pm DP$)	ZCL células sinusoidais ($\bar{X} \pm DP$)	P
CONTROLE	0,7±0,8	0,8±1,0	>0,05
IR	5,7±1,8	14,8±6,7	0,02
PCI+IR	2±2,2	4,0±3,6	>0,05
L-a+IR	1,8±2,3	4,8±3,3	<0,01

Apoptose – Atividade da Caspase 3	ZP hepatócitos ($\bar{X} \pm DP$)	ZP células sinusoidais ($\bar{X} \pm DP$)	P
CONTROLE	0,7±1,0	0,8±0,8	>0,05
IR	4,7±3,8	12,5±5,5	0,01
PCI+IR	1,0±1,5	4,7±3,7	0,02
L-a+IR	2,2±1,9	7,7±6,4	0,05

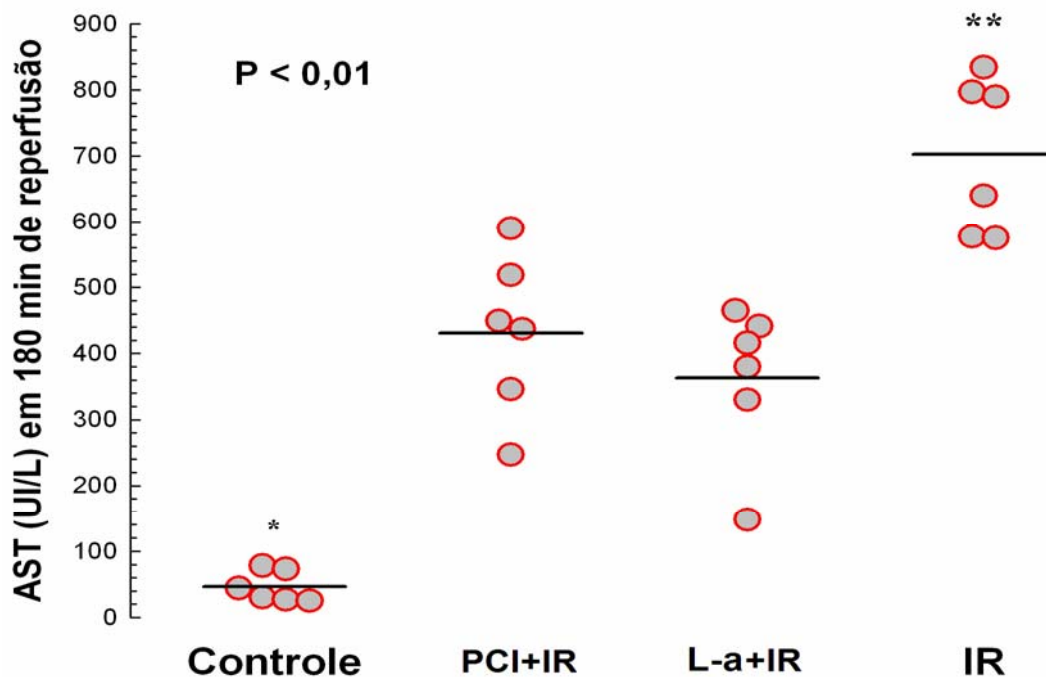
$\bar{X} \pm DP$: média±desvio padrão.

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

ZCL: zona centro lobular; ZP: zona portal.

10. ANEXOS
10.2. Gráficos

10.2.1 Níveis séricos de asparatato aminotransferase (AST), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos, submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal).



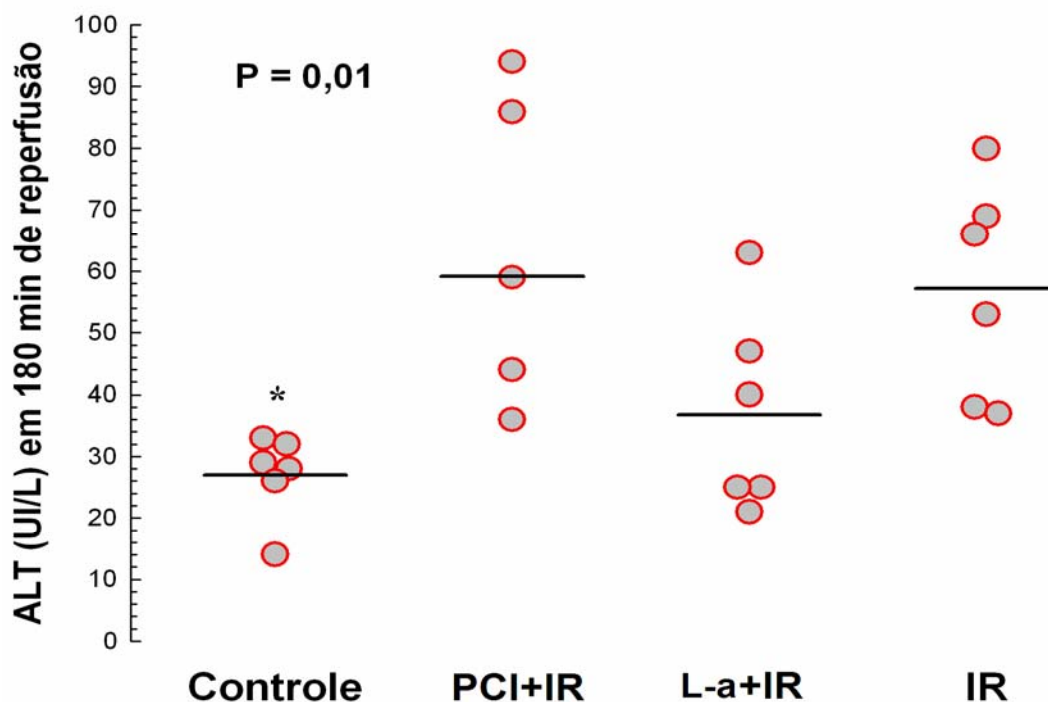
* $P < 0,01$ compara grupo controle com grupos IR, PCI+IR e L-a+IR.

** $P < 0,01$ compara grupo IR com grupos PCI+IR e L-a+IR.

ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; AST: aspartato aminotransferase.

10.2.2 Níveis séricos de alanino amonotransferase (ALT), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos, submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal).

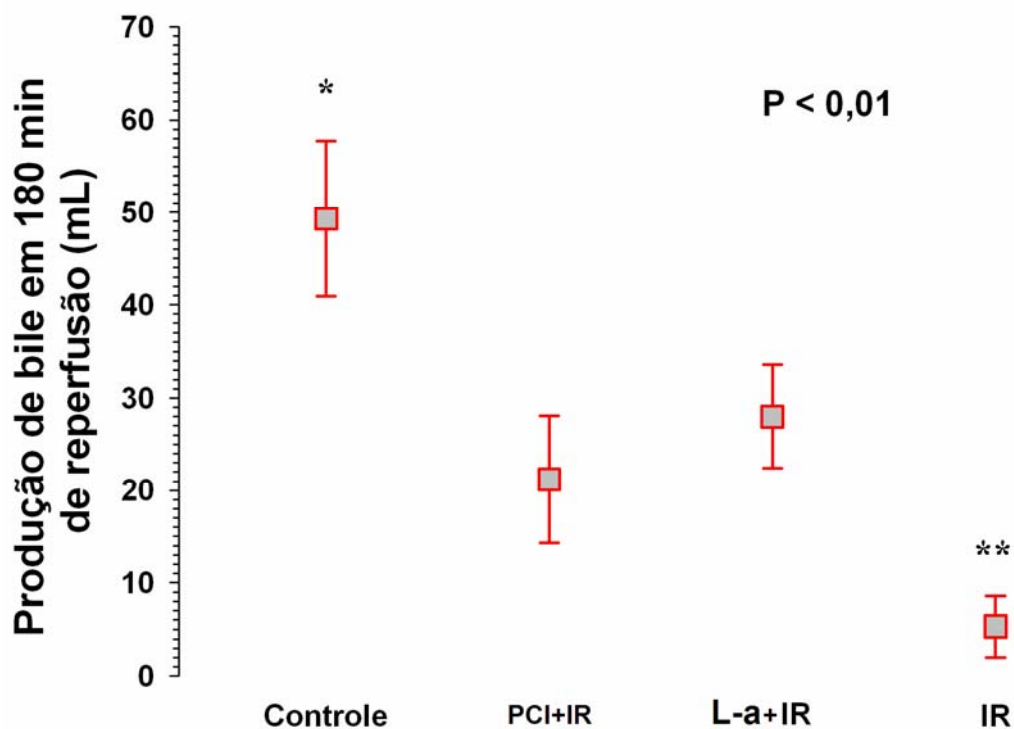


* $P=0,01$ compara grupo controle com grupos IR e PCI+IR.

ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P<0,05$

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; alanino amonotransferase (ALT).

10.2.3 Produção de bile durante os 180 minutos de reperfusão, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos, submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal).



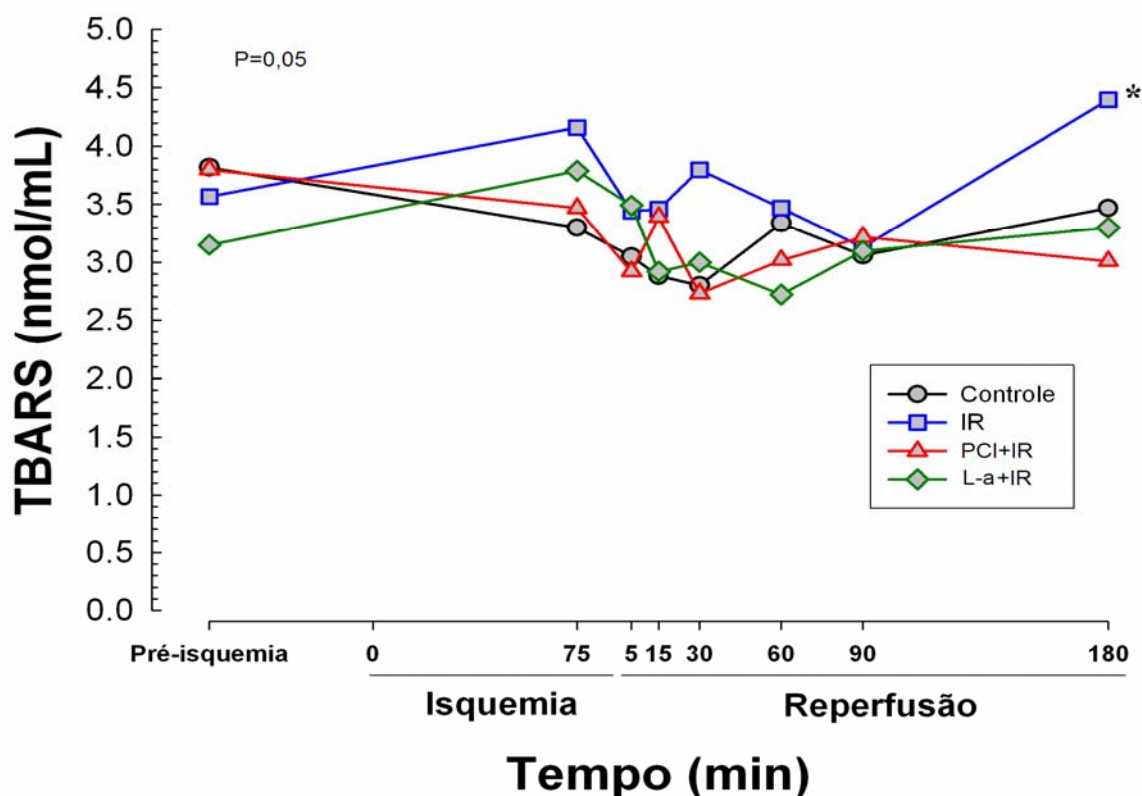
* $P < 0,01$ compara grupo controle com grupos IR, PCI+IR e L-a+IR.

** $P < 0,01$ compara grupo IR com grupos controle, PCI+IR e L-a+IR.

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

10.2.4 Níveis séricos das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos, submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal).

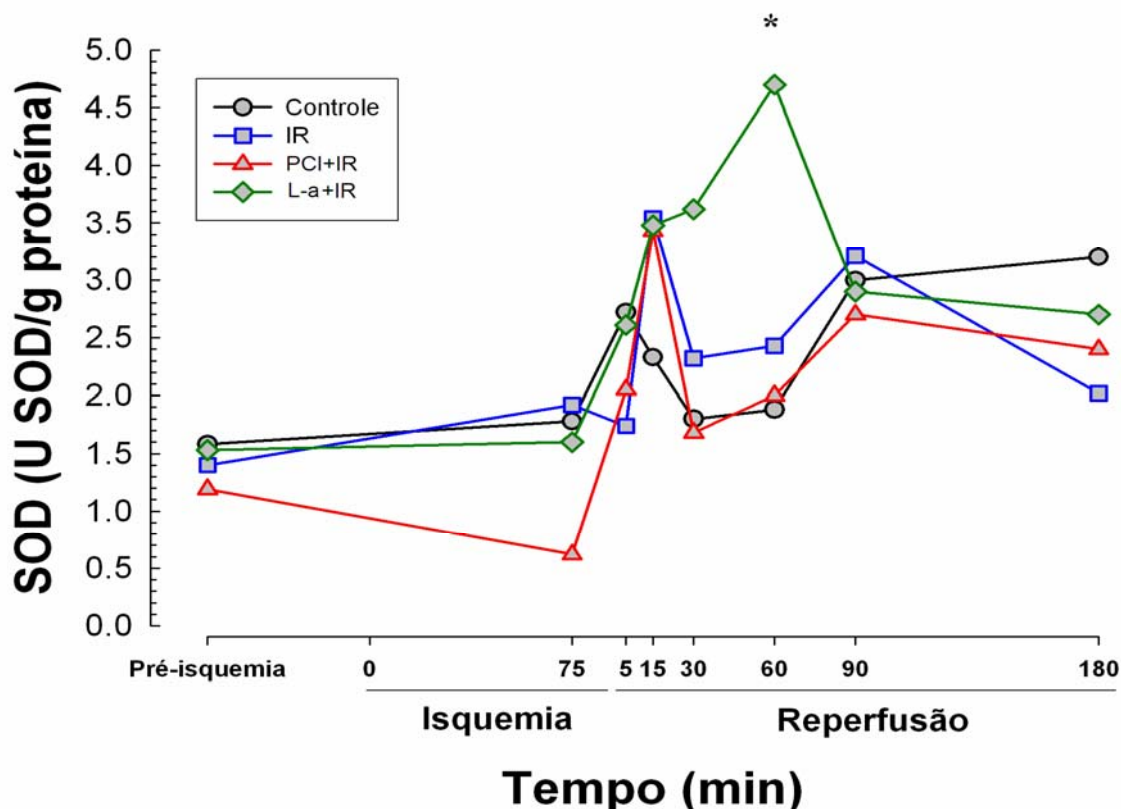


* $P < 0,01$ compara grupo IR com grupo PCI+IR.

Dados são apresentados como médias; Análise de variância de medidas repetidas; $P < 0,05$.

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

10.2.5 Níveis séricos da SOD, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos, submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal).

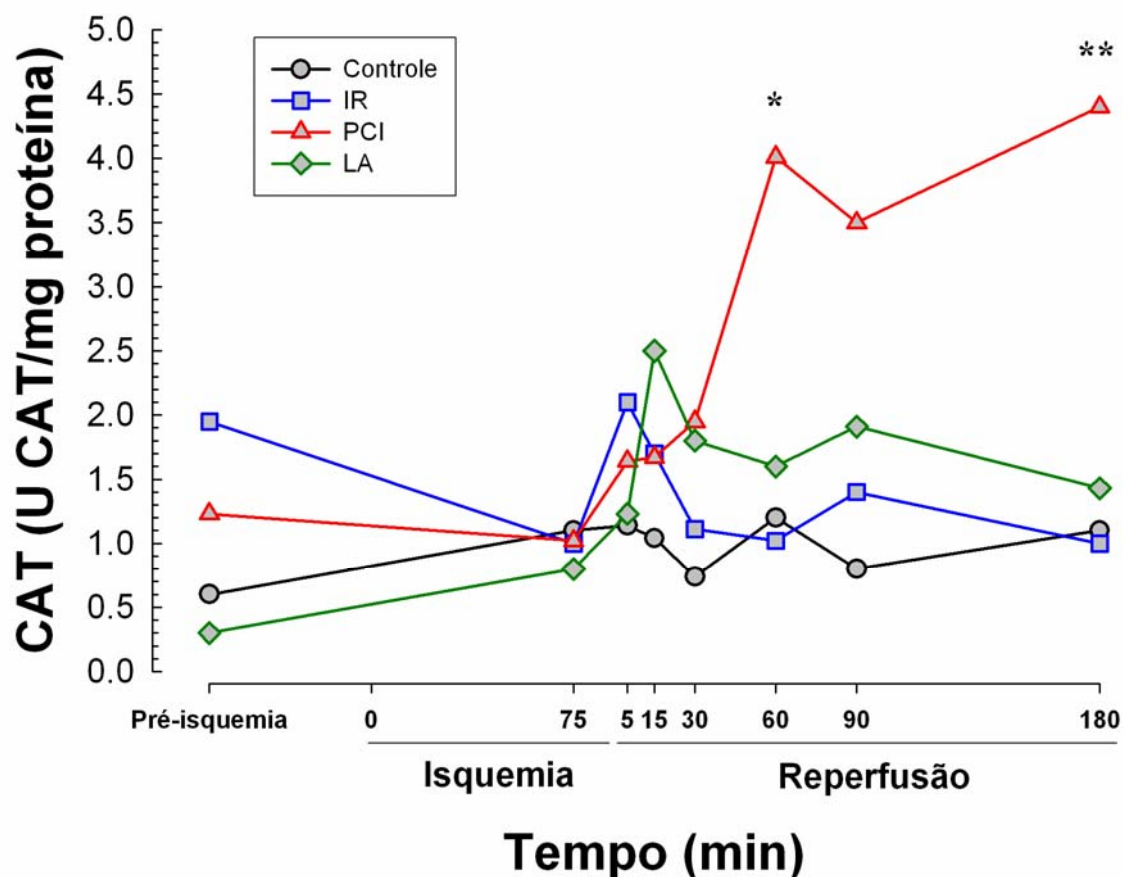


* $P=0,04$ compara grupo L-a+IR com grupo controle e grupo PCI+IR.

Dados são apresentados como médias; Análise de variância de medidas repetidas; $P<0,05$.

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

10.2.6 Níveis séricos da CAT, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos, submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal).



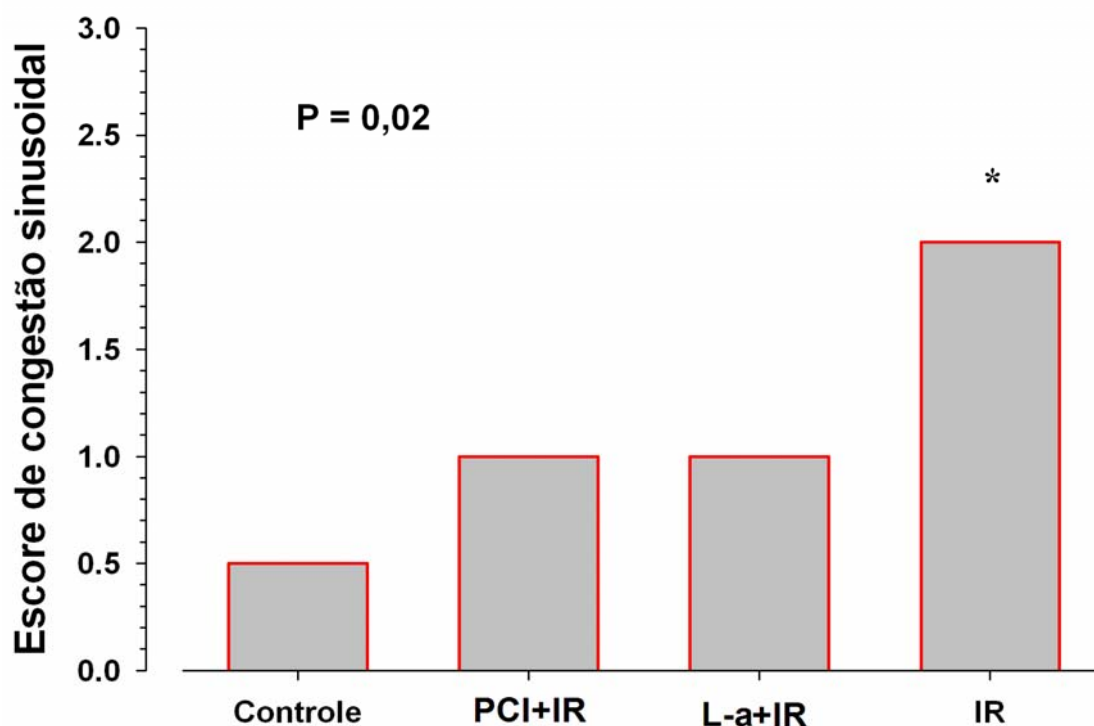
* $P=0,02$ compara grupo PCI+IR com grupo controle e grupo IR.

** $P<0,01$ compara grupo PCI+IR com grupos controle, IR e L-a+IR.

Dados são apresentados como médias; Análise de variância de medidas repetidas; $P<0,05$.

Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

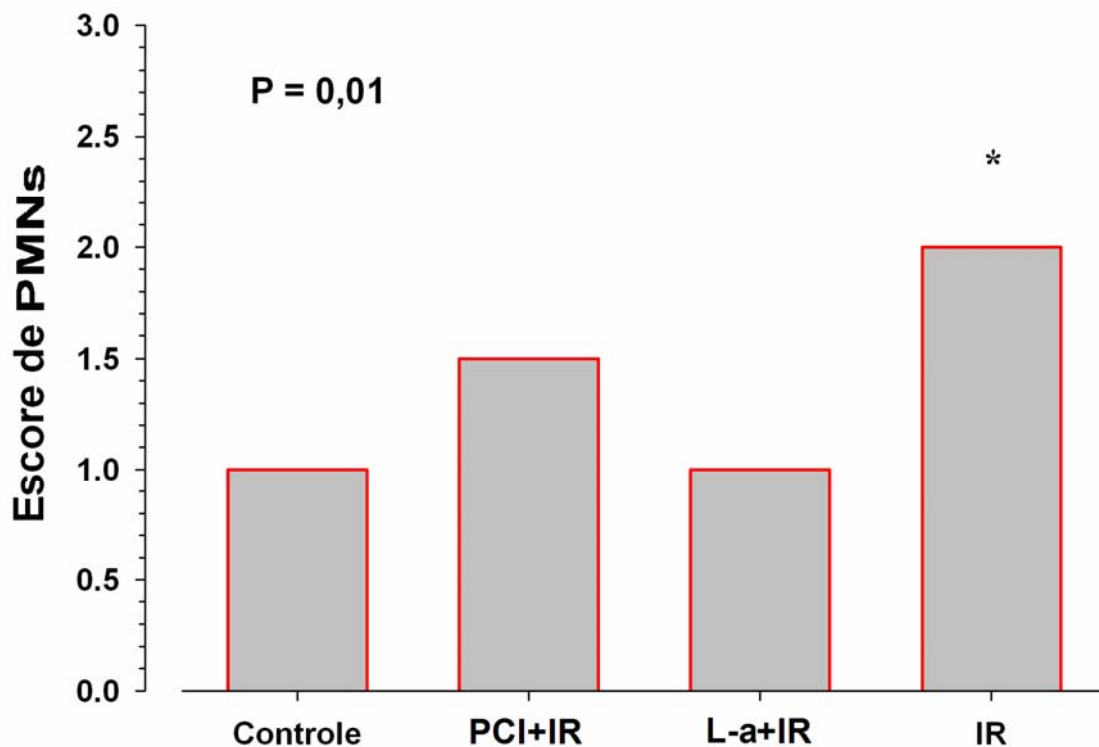
10.2.7 Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na congestão sinusoidal.



***P=0,02 compara grupo IR com controle.**

Escore (mediana) de lesão hepática avaliada por meio da microscopia óptica, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico e farmacológico com L-arginina. *A congestão sinusoidal foi significativamente maior no grupo IR versus grupo-controle (P=0,02). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Os escores foram ordenados em postos e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey; P<0,05.

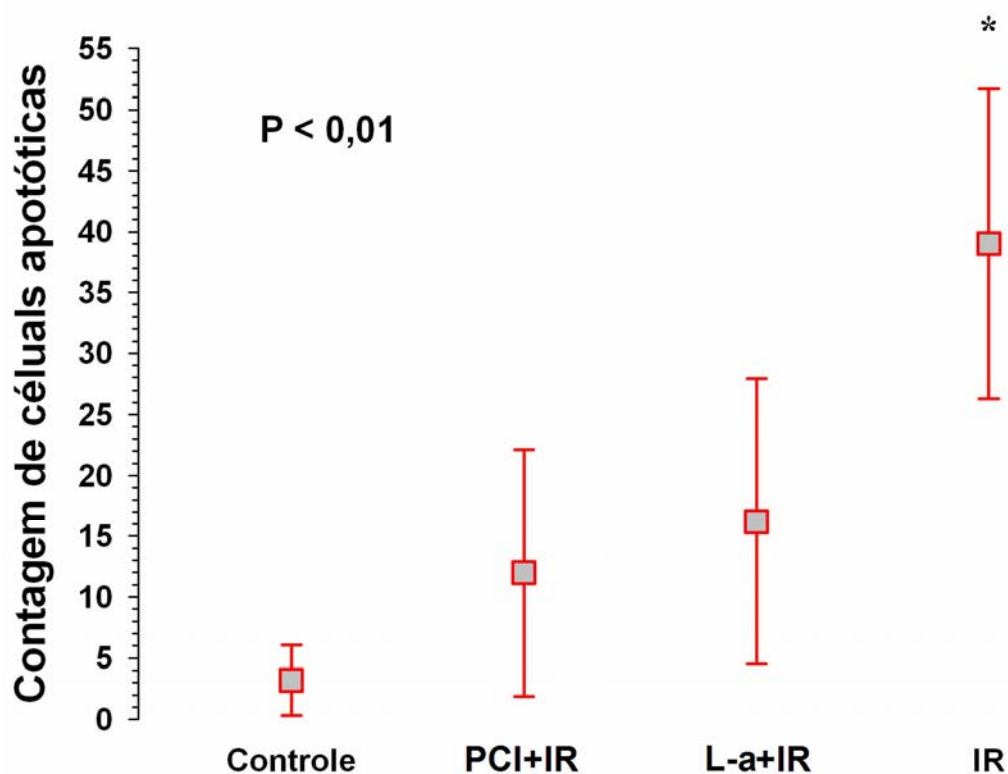
10.2.8 Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na infiltração de polimorfonucleares.



*** P=0,01 compara grupo IR com grupo controle e grupo L-a+IR.**

Escore (mediana) de lesão hepática avaliada por meio da microscopia óptica, em um modelo de isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ou não ao condicionamento isquêmico e farmacológico com L-arginina. *A infiltração de polimorfonucleares (PMNs) foi significativamente maior no grupo IR em relação ao grupo L-a+IR e ao grupo-controle (P=0,01). Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão. Os escores foram ordenados em postos e comparados entre os grupos com ANOVA seguido de procedimento de Tukey; P<0,05.

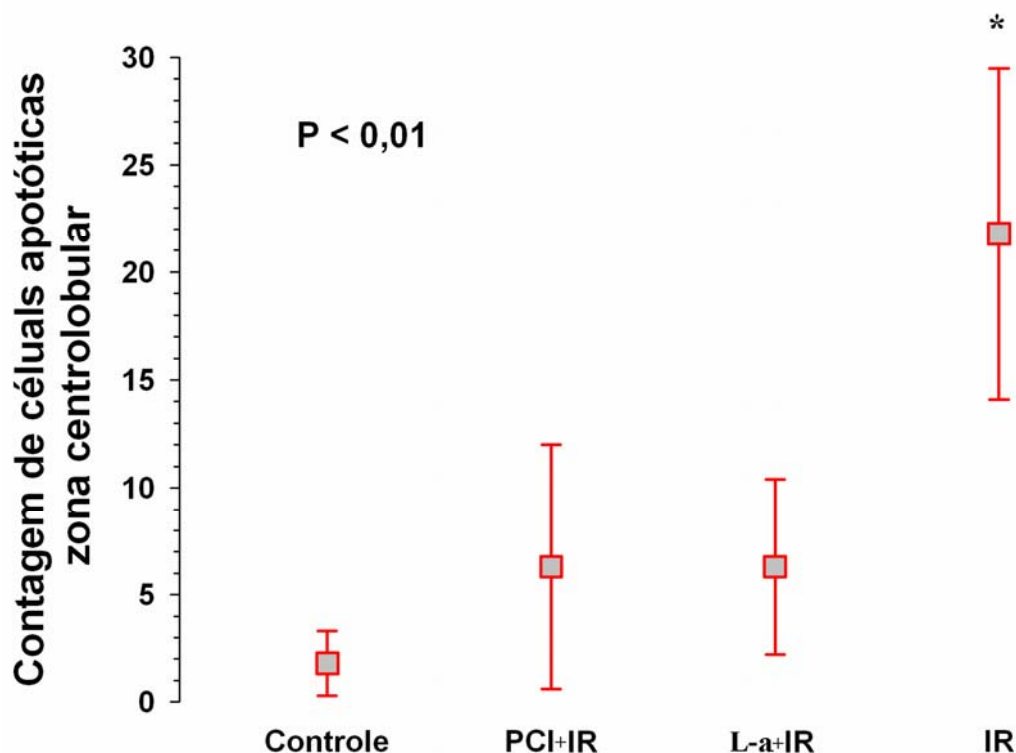
10.2.9 Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na apoptose determinada através da atividade da caspase 3 (microscopia ótica).



***P<0,01 compara grupo IR com grupos controle, PCI+IR e L-a+IR.**

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; P<0,05. Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

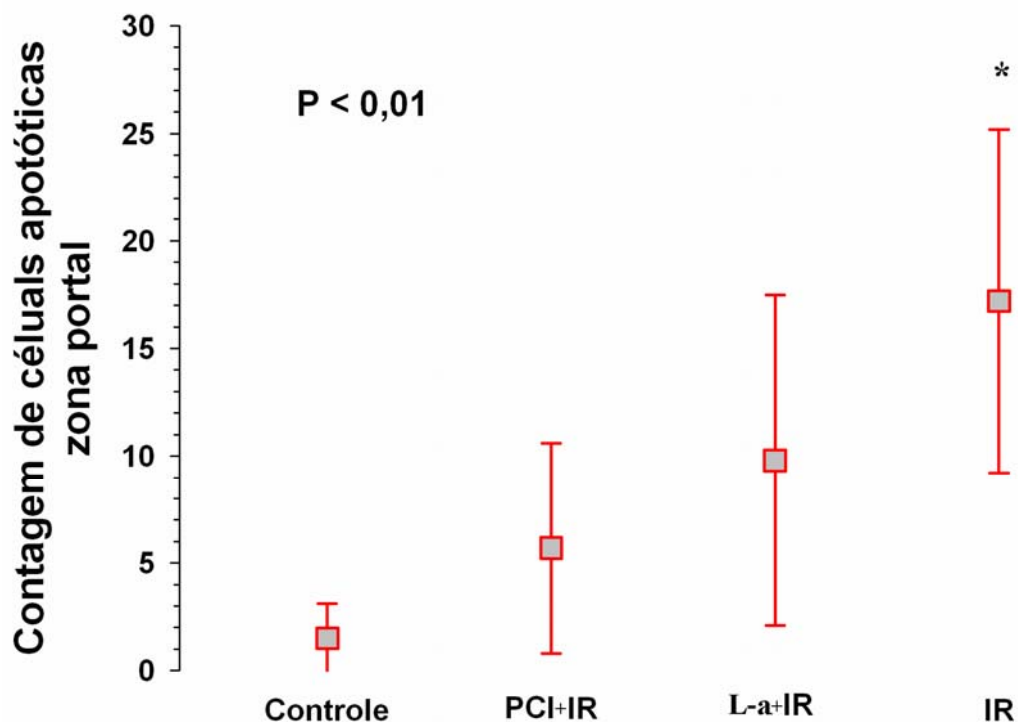
10.2.10 Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na apoptose determinada através da atividade da caspase 3 (microscopia ótica) na zona centrolobular.



***P<0,01 compara grupo IR com grupos controle, PCI+IR e L-a+IR.**

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$. Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

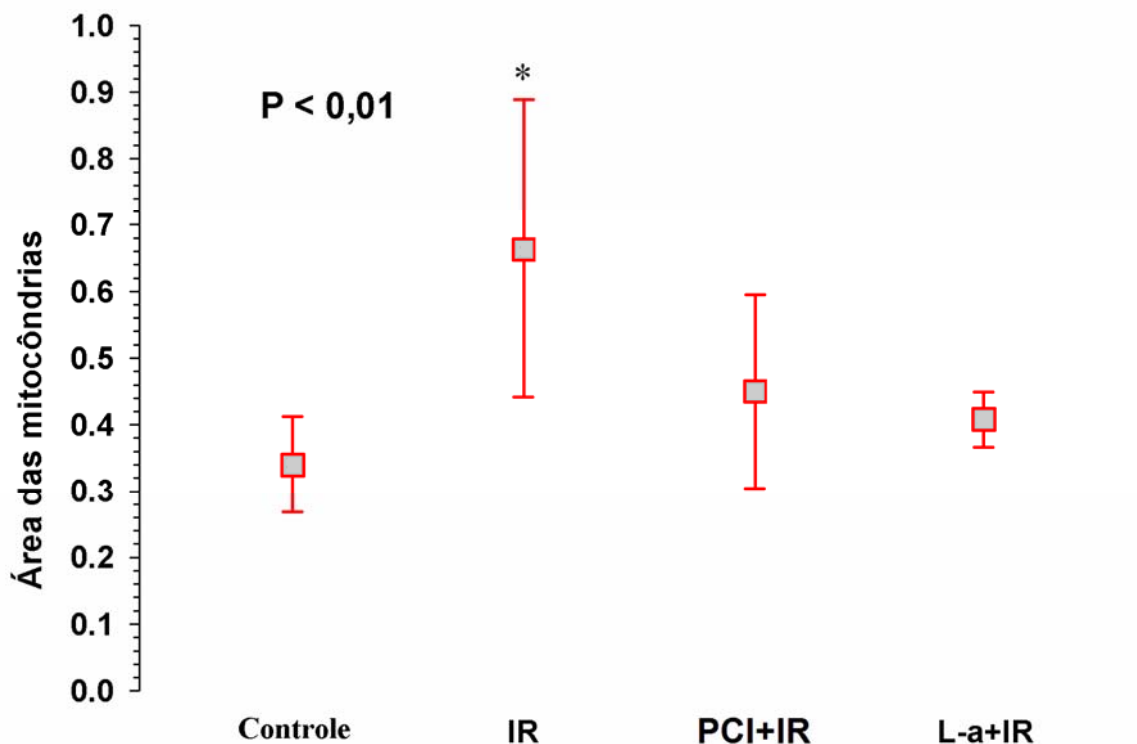
10.2.11 Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na apoptose determinada através da atividade da caspase 3 (microscopia ótica) na zona portal.



***P<0,01 compara grupo IR com grupos controle e PCI+IR.**

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P<0,05$. Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

10.2.12 Efeitos da isquemia e reperfusão hepática em suínos submetidos ao condicionamento isquêmico e farmacológico (infusão de L-arginina intraportal) na área das mitocôndrias (microscopia eletrônica).



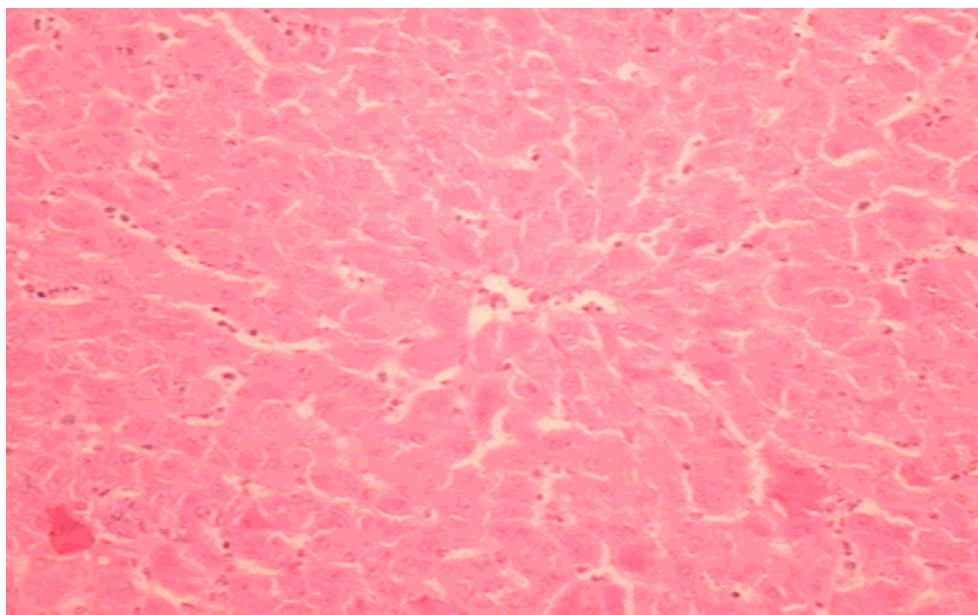
*** $P < 0,01$ compara grupo IR com grupos controle, PCI+IR e L-a+IR.**

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste de Tukey; $P < 0,05$. Grupo controle: *sham operation*; Grupo IR: isquemia por 90 minutos seguido de reperfusão por 180 minutos; Grupo PCI+IR: isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão; Grupo L-a+IR: submeteu-se o fígado a isquemia de 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão, antes dos 90 minutos de isquemia e 180 minutos de reperfusão.

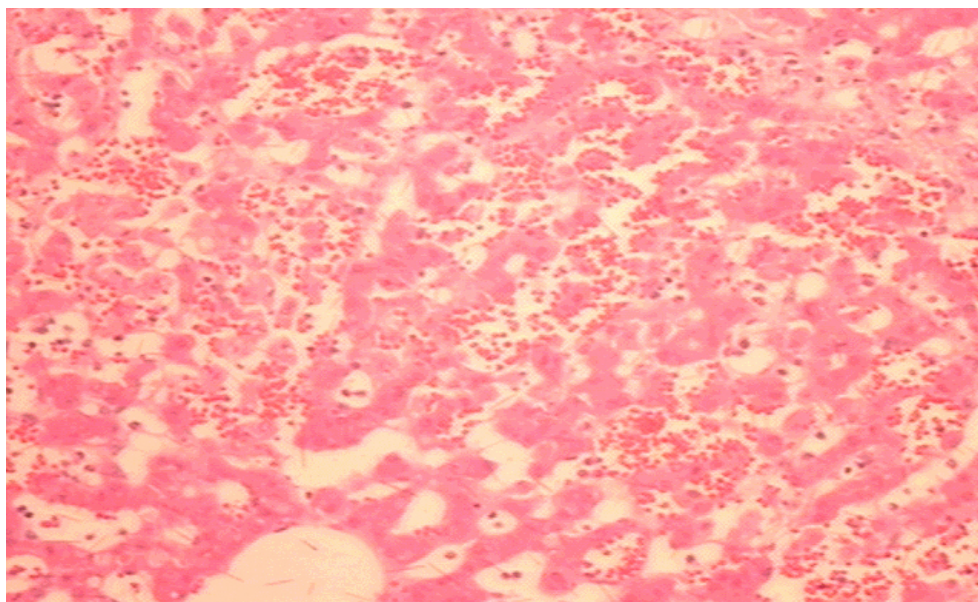
10.ANEXOS

10.3 Fotos representativas

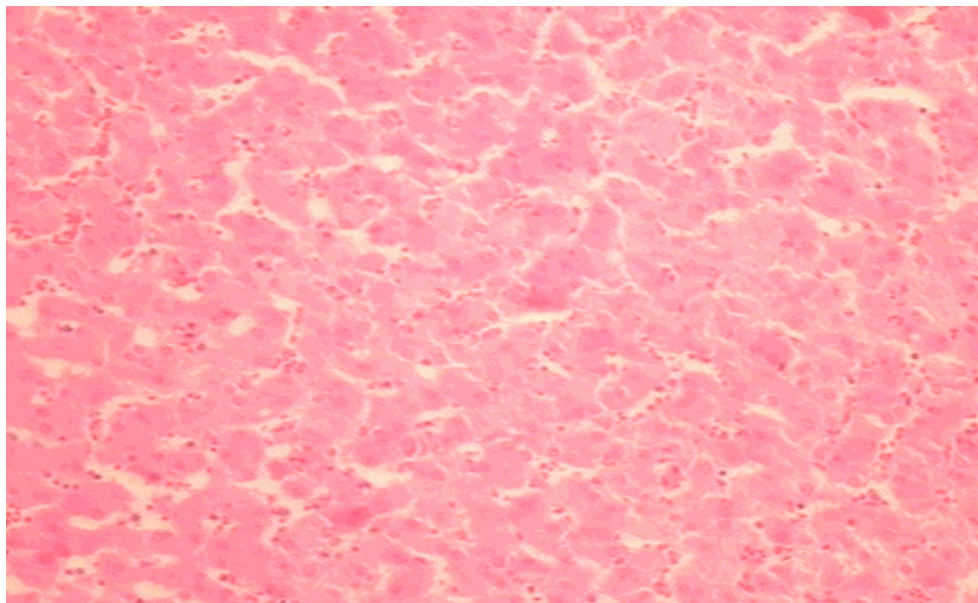
**10.3.1 Foto representativa da congestão sinusoidal, grupo controle
Hematoxilina e Eosina (100x)**



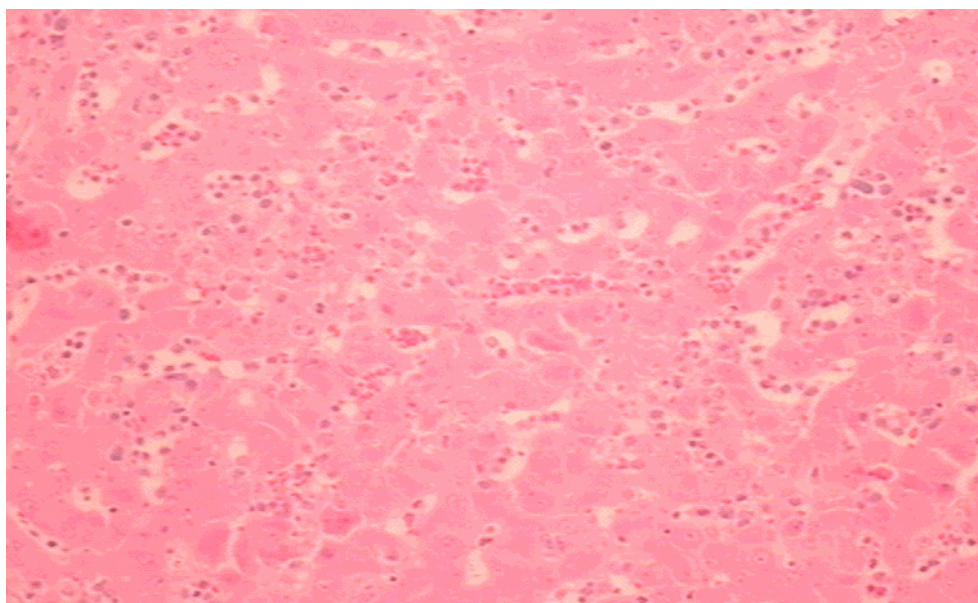
**10.3.2 Foto representativa da congestão sinusoidal, grupo não
precondicionado
Hematoxilina e Eosina (100x)**



**10.3.3 Foto representativa da congestão sinusoidal, grupo
precondicionamento isquêmico
Hematoxilina e Eosina (100x)**

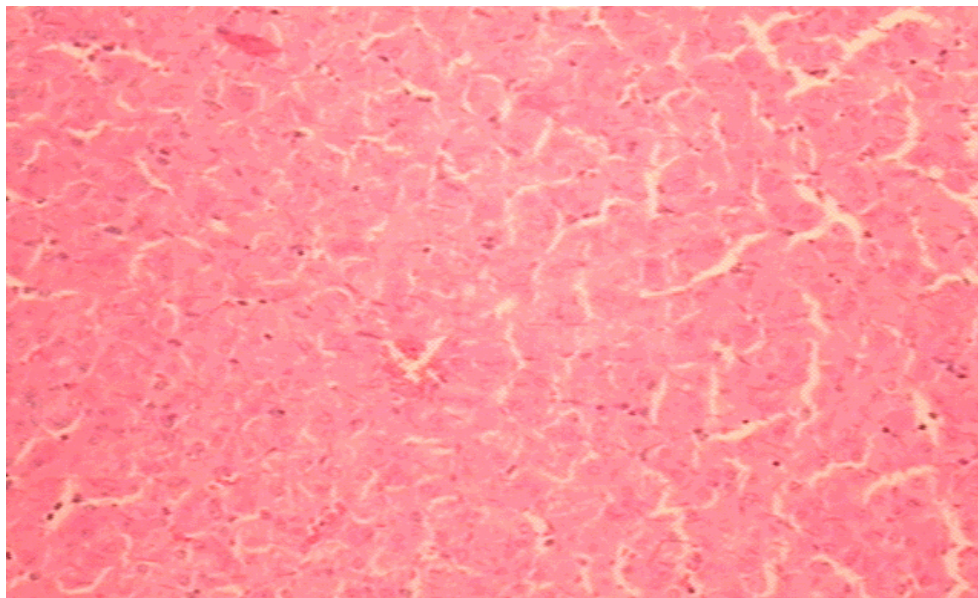


**10.3.4 Foto representativa da congestão sinusoidal, grupo
precondicionamento farmacológico com L-arginina intraportal
Hematoxilina e Eosina (100x)**



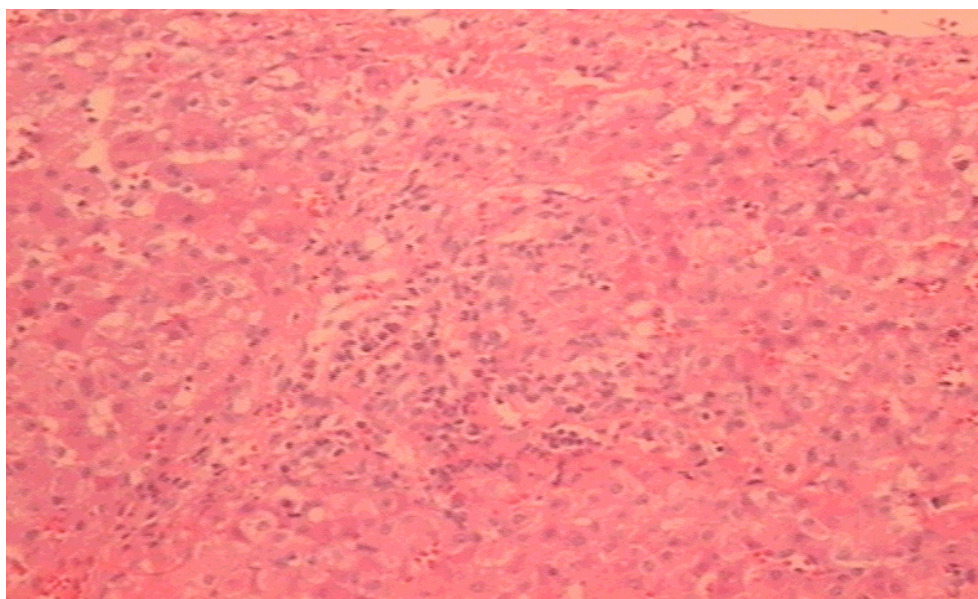
**10.3.5 Foto representativa da infiltração de polimorfonucleares,
grupo controle**

Hematoxilina e Eosina (100x)

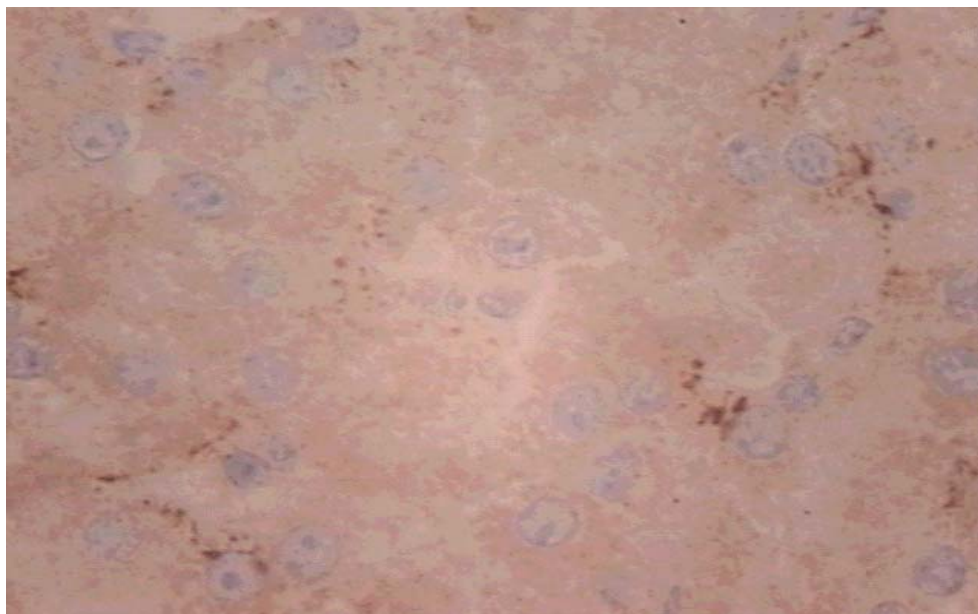


**10.3.6 Foto representativa da infiltração de polimorfonucleares,
grupo não condicionado**

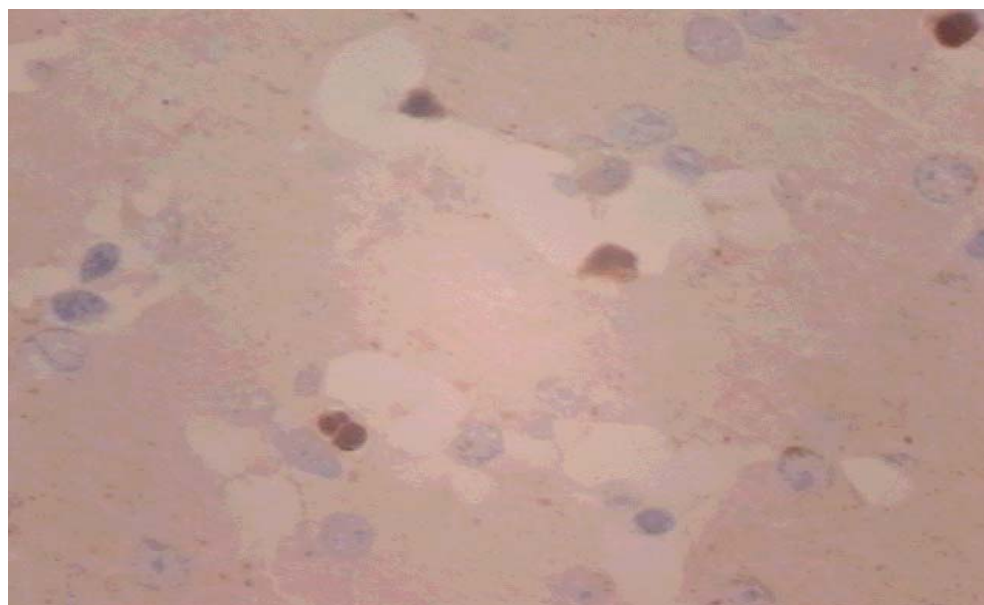
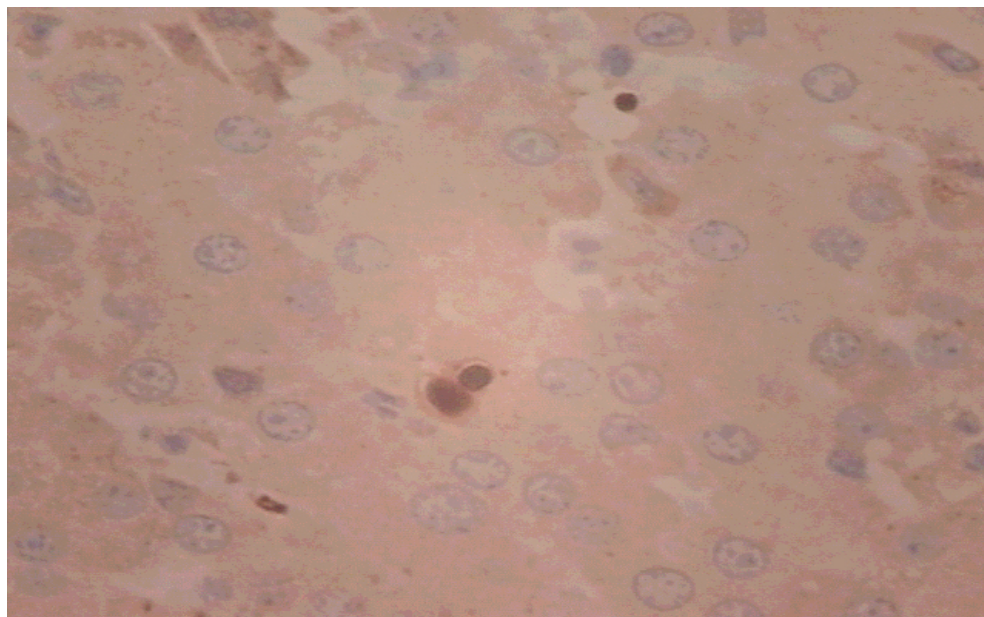
Hematoxilina e Eosina (100x)



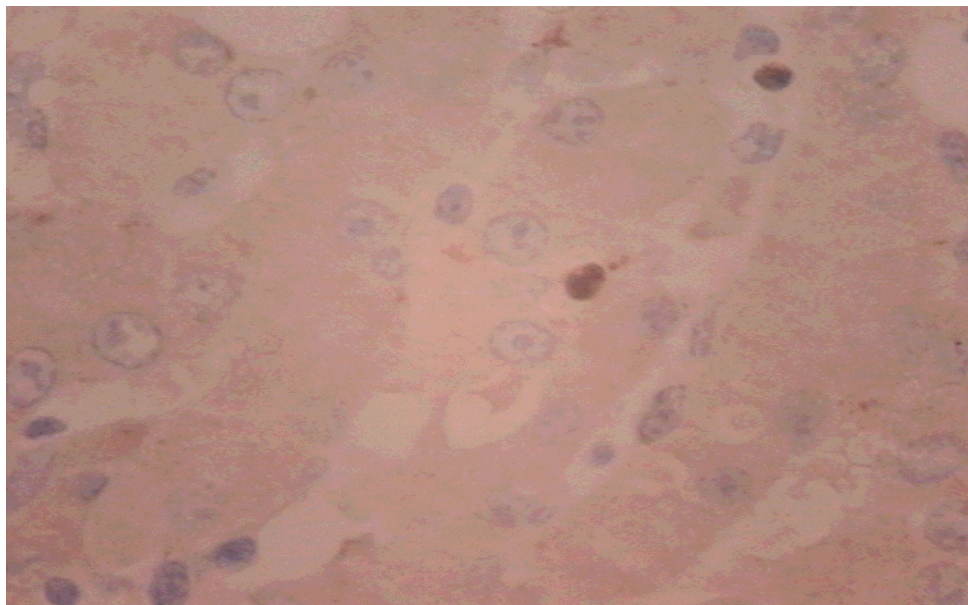
**10.3.7 Fotos representativa da atividade da caspase 3, grupo controle
Imunocoloração para caspase 3 (400x)**



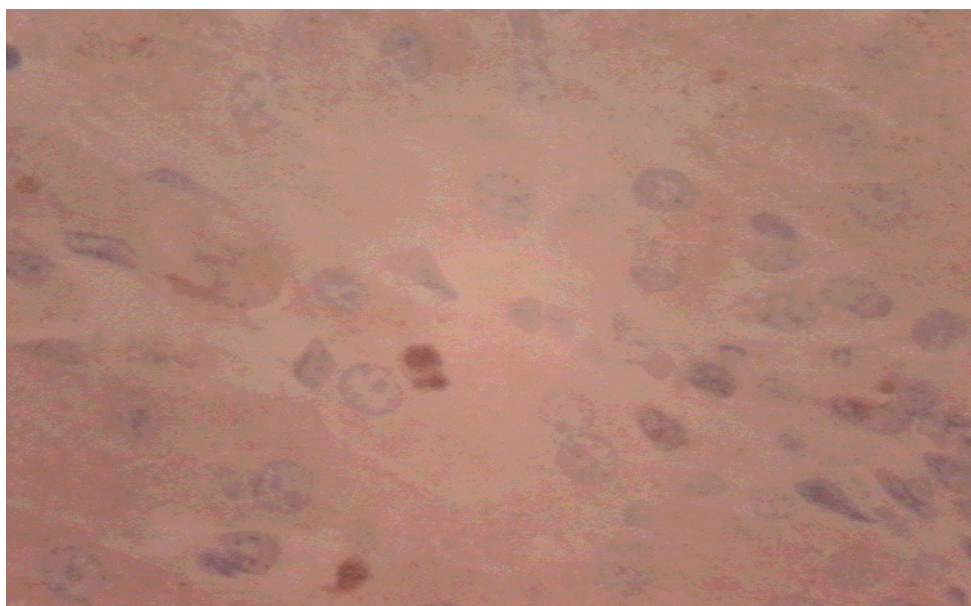
**10.3.8 Fotos representativa da atividade da caspase 3, grupo não
precondicionado
Imunocoloração para caspase 3 (400x)**



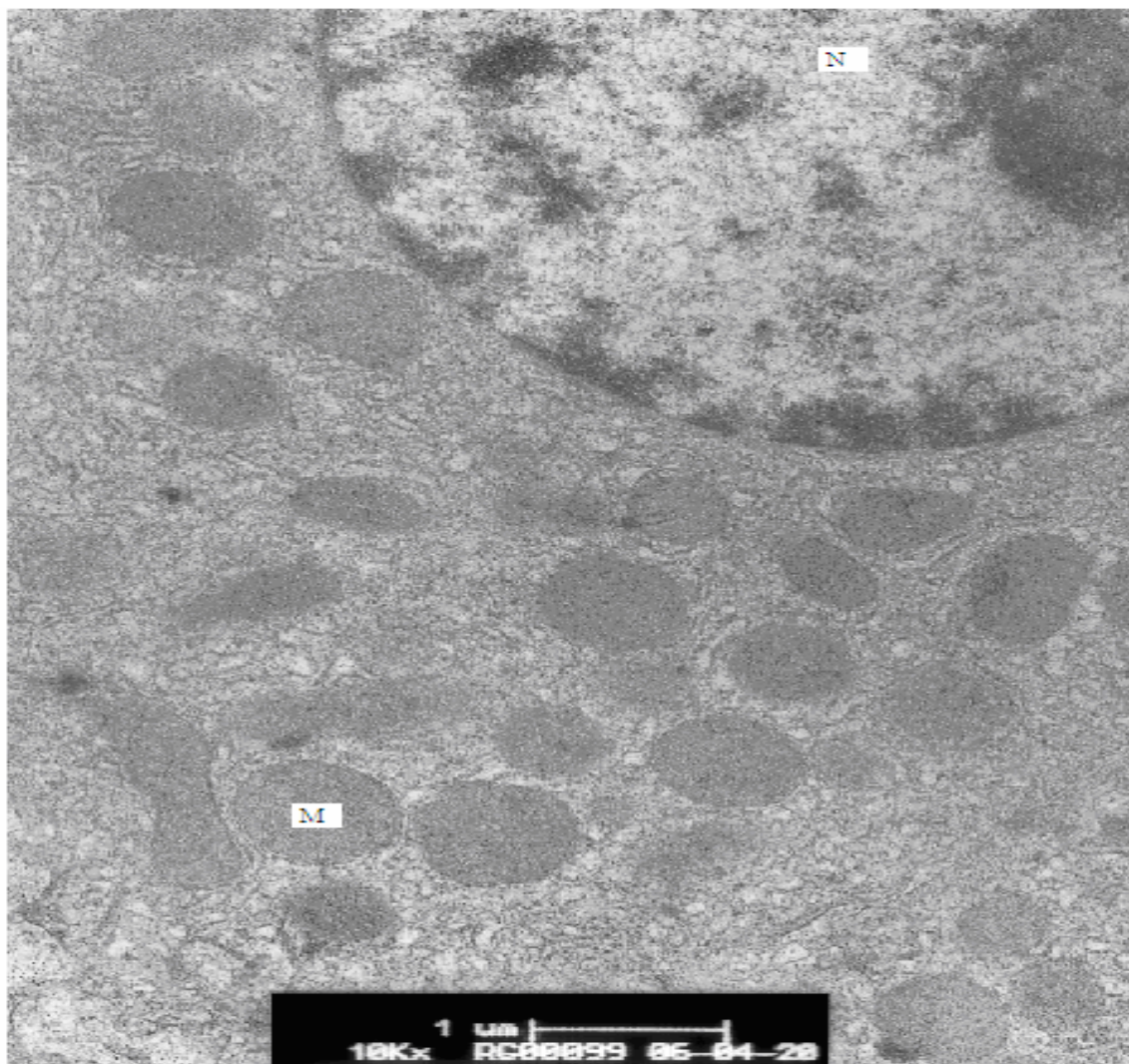
**10.3.9 Fotos representativa da atividade da caspase 3, grupo
precondicionamento isquêmico
Imunocoloração para caspase 3 (400x)**



**10.3.10 Fotos representativa da atividade da caspase 3, grupo
precondicionado farmacologicamente com L-arginina intraportal
Imunocoloração para caspase 3 (400x)**



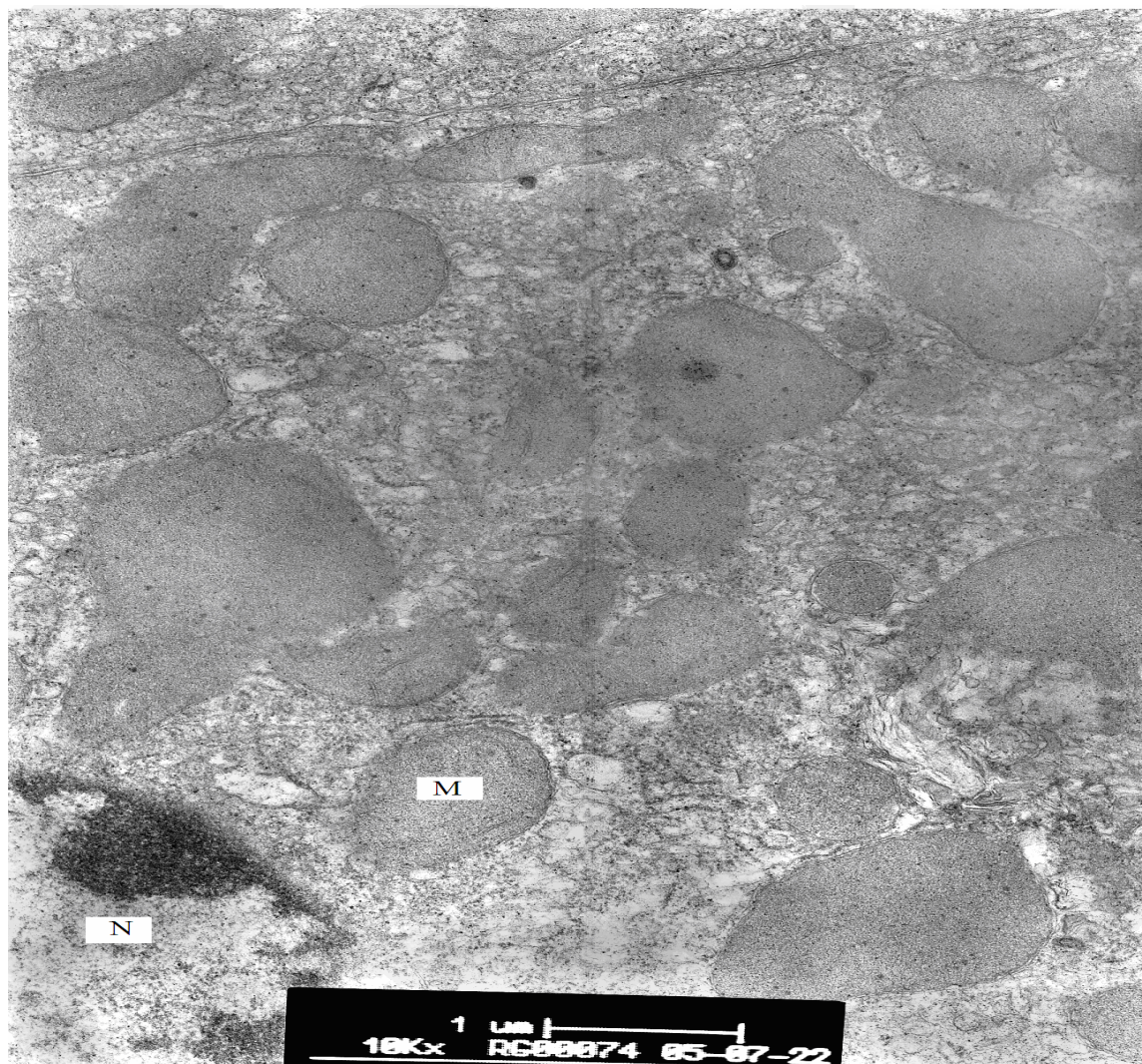
10.3.11 Foto representativa das mitocôndrias, grupo controle
Microscopia eletrônica (10000x)



M: mitocôndria

N: núcleo

10.3.12 Foto representativa das mitocôndrias, grupo não condicionado
Microscopia eletrônica (10000x)

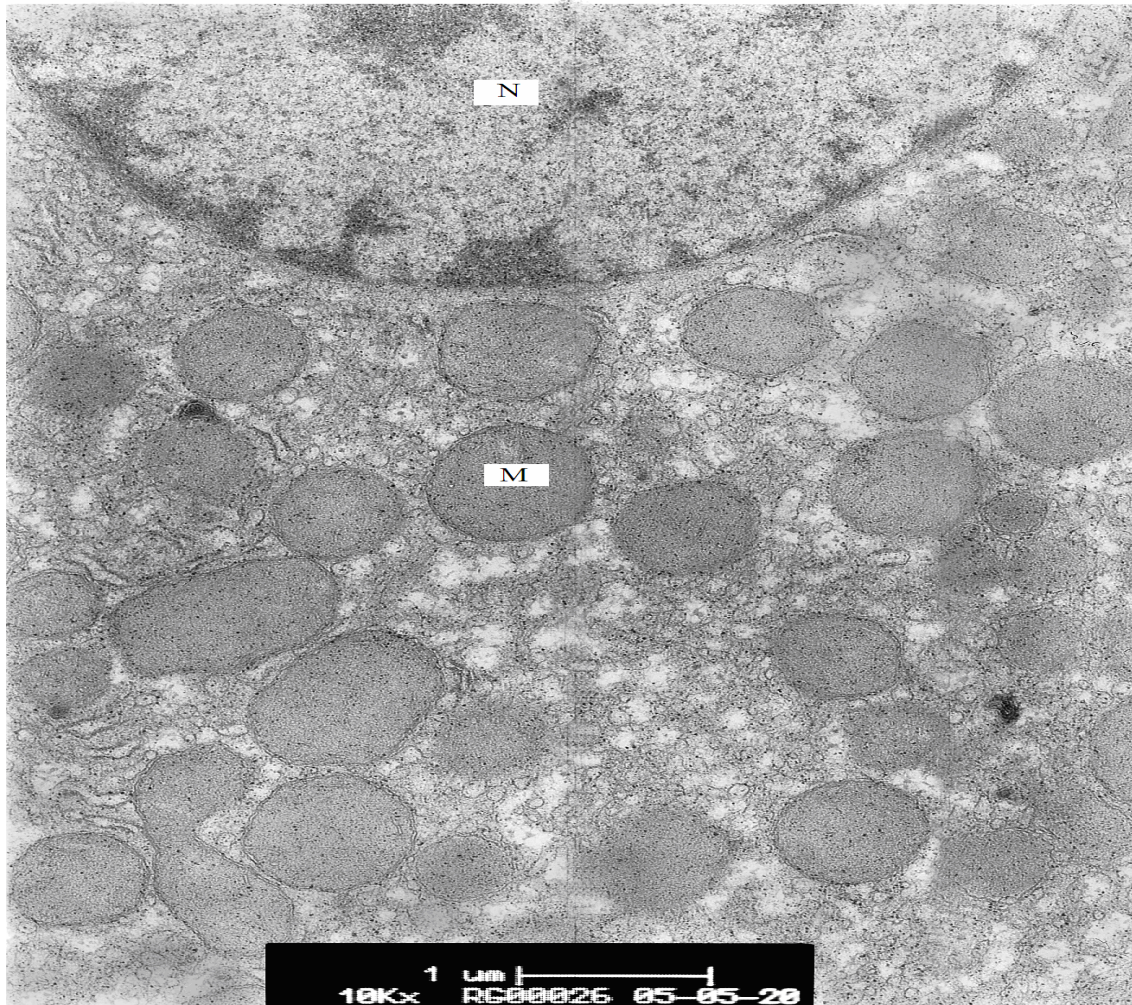


M: mitocôndria

N: núcleo

**10.3.13 Foto representativa das mitocôndrias, grupo condicionamento
isquêmico**

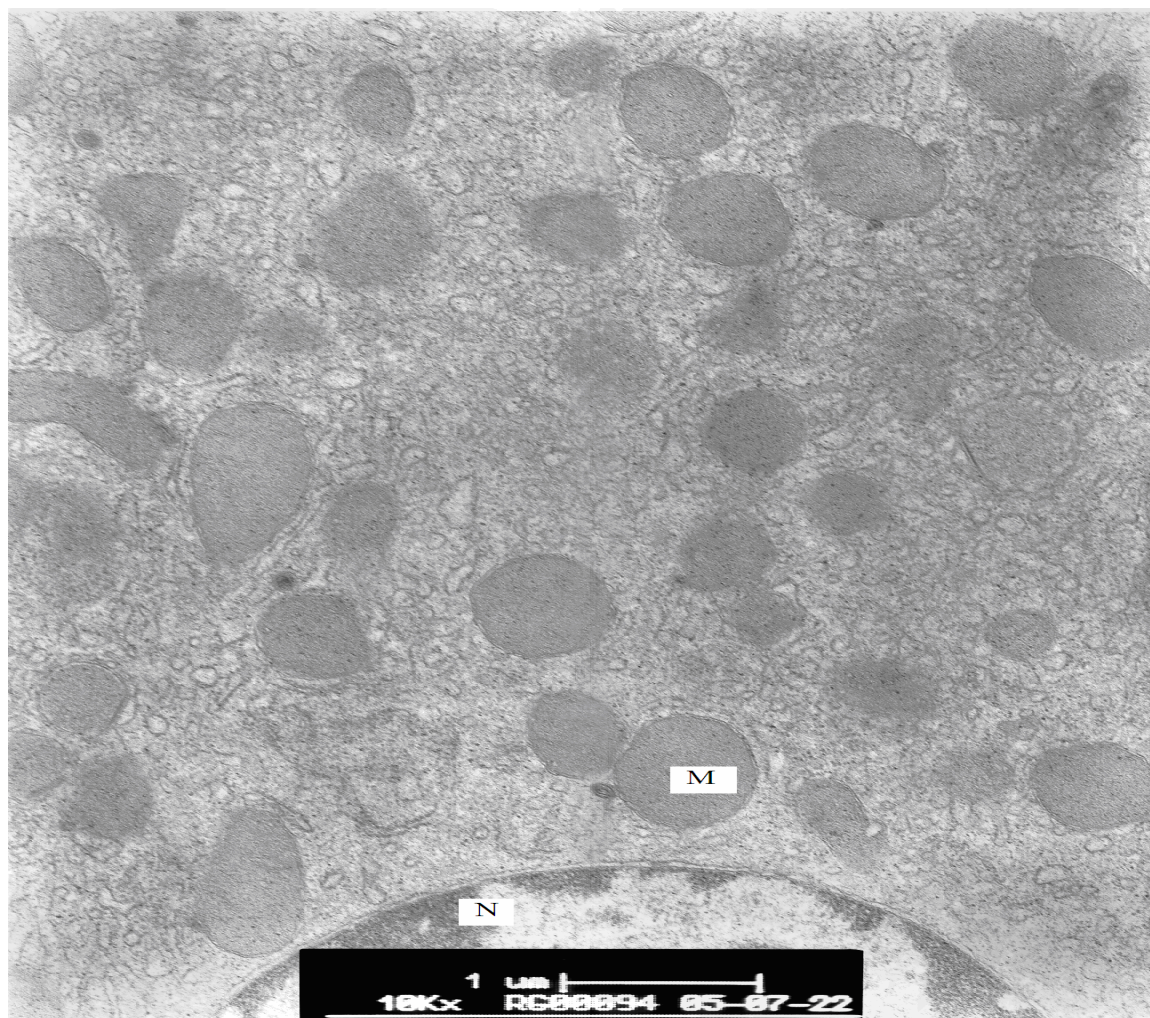
Microscopia eletrônica (10000x)



M: mitocôndria

N: núcleo

10.3.14 Foto representativa das mitocôndrias, grupo condicionamento farmacológico com L-arginina intraportal
Microscopia eletrônica (10000x)



M: mitocôndria

N: núcleo