

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

**COMPARAÇÃO ENTRE FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO E  
SOLUÇÃO DA UNIVERSIDADE DE WISCONSIN NA  
PRESERVAÇÃO DE FÍGADOS DE RATOS:  
A PROTEÇÃO CONTRA O DANO PRECOCE  
ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

Dissertação de Mestrado

Raquel Scherer de Fraga

Orientador: Dr Mário Reis Álvares-da-Silva

---

Âncoras içadas,  
velas de peito cheio  
em pulmonares respirações.  
É o início da jornada  
congratulada de emoções.  
E os bravos do navio  
comandam a batalha  
dando ondas a imaginação.

Realezas que cortam mares  
quando abre-se o porão,  
fugas dos dissabores  
ao encontro do coração.  
E nenhuma espada cortará o peito,  
pois é o peito  
a maior proteção.

Marujos conduzem a nau  
na trilha em que se perdeu a sina.  
E o menino cresceu guerreiro,  
e os amores ficaram pra trás,  
e as vidas perderam o sentido  
se passando sobre o convés.

Mas é nisto que o sentido está!  
Navegar até com braços,  
nunca se esgotar.

E jamais jogar  
os sonhos aos tubarões.

**Bravos Sonhos**

Jackson Sala

---

---

## Dedicatória

*Para **Luís**, meu noivo, pelo companheirismo e carinho cotidiano durante estes últimos 5 anos em que estive ao meu lado.*

*Para minha mãe, **Venita**, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de dignidade e retidão de caráter.*

---

---

## **Agradecimentos especiais**

Ao **Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva**, meu orientador e amigo, por sua admirável competência e dedicação. Não posso deixar também de agradecê-lo por ter cultivado em mim a curiosidade científica, além de me guiar pelos caminhos da Hepatologia.

Ao meu colega de faculdade, **Dr. Cleber Rosito Pinto Kruel**, pela sua inesgotável paciência e por ter proporcionado a realização deste trabalho através de sua exímia habilidade cirúrgica.

---

---

## Agradecimentos

*Ao Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, representado por todos seus professores e médicos contratados, por ter me ensinado os princípios da Gastroenterologia. Certamente, levo comigo características singulares de cada um.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, pelo constante aprendizado, confiança e incentivo.*

*Aos meus colegas de mestrado, Dra Siluê Zanetti Franzoni Dal Molin, Dra Stela Maria Mota e Dr Gabriel Guinsburg Barlem, por terem compartilhado várias horas de trabalho, tornando-as mais agradáveis.*

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

*À Equipe do Laboratório de Biofísica da PUCRS, especialmente ao José Mateus Pra Guaragna, à Catherine Stragliotto Isoppo e ao Paulo Marcel Comis Ramos, pelas inúmeras horas dispensadas a este estudo.*

*Ao Prof. Dr. André Arigony Souto e à Paula Elisa Tischler Heinen, pelo desenvolvimento da técnica de análise mitocondrial, além da dedicação e disponibilidade demonstrados.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski, pela análise histológica.*

*À Prof. Dra. Roseli de Oliveira Möllerker, pelo seu entusiasmo e sugestões fornecidas.*

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

*Ao meu colega de mestrado e veterinário da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, Sr. Marcos Eugênio Soares Duarte, pela sua dedicação, auxílio e paciência.*

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

*Aos acadêmicos de Medicina, Glauber Gasperin e Luciana Harlacher, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e coleta de material.*

---

---

*Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, **Sra. Moema Vianna Goulart** e **Sra. Jamile da Silva Ladeira**, pela competência, dedicação e carinho dispensados.*

*A **Sra. Fabiana Silva da Silva**, secretária do Centro de Pesquisas do HCPA, pela competência e disposição no exercício de suas funções.*

*Ao **Sr. Fernando Augusto Soares**, secretário do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela sua competência e dedicação.*

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

---

---

## **SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS **III**

LISTA DE TABELAS **V**

LISTA DE FIGURAS **VI**

RESUMO **VII**

ABSTRACT **VIII**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1. A lesão de isquemia/reperfusão **2**

1.2. O estresse oxidativo **4**

1.3. As soluções de preservação **7**

1.3.1. A solução da Universidade de Wisconsin **7**

1.3.2. A frutose -1,6- bisfosfato **9**

2. JUSTIFICATIVA **11**

3. OBJETIVOS **12**

3.1. Objetivo geral **12**

3.2. Objetivos específicos **12**

4. MATERIAIS E MÉTODOS **13**

4.1. Desenho do estudo e animais de experimentação **13**

4.2. Procedimentos **13**

4.2.1. Primeira etapa (hepatectomia) **13**

4.2.2. Segunda etapa (preservação a frio do fígado) **14**

4.2.3. Terceira etapa (preparo do rato "receptor") **14**

4.2.4. Quarta etapa (reperfusão do órgão preservado) **15**

4.2.5. Quinta etapa (avaliação do I/R e EO) **15**

4.2.6. Sexta etapa (análise histológica) **17**

---

---

4.3. Tamanho da amostra	<b>18</b>
4.4. Análise estatística	<b>18</b>
4.5. Aspectos éticos	<b>18</b>
5. FINANCIAMENTO	<b>20</b>
6. RESULTADOS	<b>21</b>
6.1. Preservação a frio	<b>21</b>
6.2. Reperusão	<b>23</b>
6.3. Análise anatomopatológica	<b>23</b>
7. DISCUSSÃO	<b>29</b>
7.1. Em relação ao desenho do estudo	<b>29</b>
7.2. Em relação aos resultados durante isquemia a frio	<b>33</b>
7.3. Em relação aos resultados após a reperusão	<b>34</b>
7.4. Limitações do estudo	<b>37</b>
7.5. Possíveis aplicações futuras do estudo	<b>38</b>
8. CONCLUSÕES	<b>39</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<b>40</b>
ANEXOS	<b>52</b>
1. Fluxograma do procedimento experimental	<b>52</b>
2. Protocolo para análise da biópsia de reperusão	<b>53</b>
3. Artigo para publicação	<b>54</b>

---



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTO= Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos  
AEEH= Asociación Española para El Estudio del Hígado  
ALT= alanina aminotransferase  
AST= aspartato aminotransferase  
ATP= trifosfato de adenosina  
CAPES= Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CES= células endoteliais sinusoidais  
CIOMS= Council for International Organizations of Medical Sciences  
CMU-1= solução da Universidade de Medicina da China  
COBEA= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
CREAL= Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório  
DNA= ácido desoxirribonucléico  
eNOS= óxido nítrico sintetase endotelial  
EO= estresse oxidativo  
ERN= espécies reativas do nitrogênio  
ERO= espécies reativas do oxigênio  
FBP= frutose -1,6- bisfosfato  
FIPE= Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos  
G6P= glicose-6-fosfato  
HCPA= Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
HE= hematoxilina-eosina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= peróxido de hidrogênio  
HTK= histidina-triptofano-cetoglutarato  
IASP= International Association for the Study of Pain  
ILAR= Institute for Laboratory Animal Research  
I/R= dano de isquemia/reperfusão  
LDH= lactato desidrogenase  
MDA= malondialdeído  
NADPH= fosfato-dinucleotideo-adenina-nicotinamida  
NO= óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>= nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>= nitrato  
NOS= óxido nítrico sintetase

---

$O_2^-$  = ânion superóxido

$OH^\cdot$  = radical hidroxil

$ONOO^-$  = peroxinitrito

ONT= Organización Nacional de Trasplantes

PUCRS= Pontifícia Unviversidade Católica do Rio Grande do Sul

REP= índice de reperfusão

RL= radicais livres

SC-SP= Santa Casa de São Paulo

TBA= ácido tiobarbitúrico

TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA= ácido tricloroacético

TxH= transplante hepático

UEA= Unidade de Experimentação Animal

UFRGS= Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNESCO= United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

UNOS= United Network for Organ Sharing

UW= solução da Universidade de Wisconsin

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os componentes da UW e seu papel na proteção contra o I/R. **8**

Tabela 2. Valores de AST, ALT e LDH aferidos no líquido de preservação nos fígados preservados com UW e solução de FBP. **21**

Tabela 3. Dosagens de AST, ALT, LDH e TBARS aferidos no soro pós-reperusão. **25**

Tabela 4. Dosagem no tecido hepático de TBARS, catalase e derivados do NO após reperusão. **25**

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota glicolítica. **10**

Figura 2. Reperusão hepática. **16**

Figura 3. Níveis de AST, ALT e LDH obtidos no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio nos Grupos 1 e 2. **22**

Figura 4. Dosagem de AST, ALT, LDH e TBARS no soro pós-reperusão nos Grupos 1 e 2. **24**

Figura 5. Avaliação espectrofotométrica das mitocôndrias isoladas do tecido hepático pós-reperusão nos Grupos 1 e 2. **26**

Figura 6. Comparação gráfica dos espectros das mitocôndrias hepáticas dos Grupos 1 e 2 com o padrão das mitocôndrias hepáticas dos ratos controles. **27**

Figura 7. Aspecto do fígado após reperusão com UW. **28**

Figura 8. Aspecto do fígado após reperusão com solução de FBP. **28**

---

## RESUMO

Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um intermediário energético da rota glicolítica que vem sendo estudado como protetor celular em diversas situações patológicas, como choque séptico, e em modelos experimentais de isquemia/reperfusão em diferentes órgãos. Este estudo comparou solução de FBP com a solução da Universidade de Wisconsin (UW) durante a isquemia a frio e após a reperfusão.

Ratos adultos Wistar machos foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com as diferentes soluções de preservação: Grupo 1 (UW) e Grupo 2 (solução de FBP). Foram realizadas dosagens de AST, ALT e LDH no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio. Após 6 h, o fígado preservado foi perfundido por 15 min através de um modelo experimental de reperfusão hepática. Após este período, foi interrompido o sistema de reperfusão, sendo coletadas amostras de sangue do efluente venoso para determinação de AST, ALT, LDH e TBARS. Foram também seccionados fragmentos do fígado para análise histopatológica, dosagem de TBARS, catalase, derivados do NO e avaliação espectrofotométrica das mitocôndrias.

As dosagens de AST e LDH no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h foram significativamente maiores no Grupo 1. Entretanto, após a reperfusão os níveis de AST, ALT e LDH no soro e a atividade da catalase no tecido hepático foram maiores no Grupo 2. Em contrapartida, as medidas de TBARS e derivados do NO foram semelhantes entre os grupos. Adicionalmente, a avaliação espectrofotométrica das mitocôndrias do tecido hepático demonstrou maior alteração na vibração das proteínas da membrana mitocondrial no grupo da FBP. Na análise histológica não houve sinais de dano de preservação em nenhuma das lâminas estudadas. Entretanto, em todos os fígados do Grupo 2 houve congestão sinusoidal importante, o que não se repetiu em qualquer animal do Grupo 1.

Dessa forma, a FBP apresenta um efeito protetor durante a preservação a frio de fígados de ratos, mas não previne o dano após a reperfusão.

---

## ABSTRACT

**Background/Aims:** Fructose- 1,6- biphosphate (FBP) has been shown to exert therapeutic effects on sepsis and in models of ischemia-reperfusion on organs other than the liver. This study compared FBP and UW solution during cold storage and reperfusion.

**Methods:** Adult male Wistar rats were randomly assigned accordingly to different preservation solutions: UW or FBP. Measurements of AST, ALT and LDH were performed on samples of the cold storage solution at 2, 4 and 6 hours of preservation, and a novel isolated rat liver perfusion model was applied, and blood samples were taken for measurements of AST, ALT, LDH and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Liver fragments were processed for histological examination and for determination of TBARS, catalase and nitric oxide derivatives (NO).

**Results:** At 2, 4 and 6 hours of preservation, AST and LDH was lower in the FBP group, but after reperfusion, serum levels of AST, ALT and LDH were higher in this group, and so was catalase activity. TBARS and NO measurements were comparable between in both groups. No signs of preservation injury were observed in any liver biopsy specimens, but sinusoidal congestion was universally present in livers preserved with the FBP solution.

**Conclusions:** FBP solution showed a protective effect for the preservation of rat livers during cold storage, but failed to prevent organ injury after reperfusion.

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, o transplante hepático (TxH) é o tratamento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves do fígado (Wiesner, 1996; Busuttil *et al*, 2005, Julapalli *et al*, 2005; McCormick & Sultan, 2005; Morika *et al*, 2005; Otte *et al*, 2005). Os seus bons resultados permitiram que o mesmo fosse ofertado mais precocemente no curso da doença hepática avançada e não mais como um ato terapêutico final realizado em condições desesperadoras.

É notável que nos últimos anos, em todo o mundo, a despeito do crescente número de TxH realizados, tenha havido um acréscimo na mortalidade em lista (UNOS, 2005; ABTO 2005). Este fato é conseqüência da maior demanda por transplante, sem que haja órgãos disponíveis para todos (Norman, 1997; Bosch, 1999; Jiménez-Romero *et al*, 1999; Melendez & Heaton, 1999; McMaster & Vadeyar, 2000; Busuttil *et al*, 2005; McCormick & Sultan, 2005; Renz *et al*, 2005; Steinbrook, 2005). Mesmo na Espanha, país onde o modelo de captação é considerado o mais eficiente do mundo, o tempo de espera em lista tem aumentado consideravelmente (AEEH, 2005; ONT, 2005). No Brasil isto não é diferente. Segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), foram realizados, no ano de 2004, 928 TxH, enquanto o número de pacientes listados é três vezes maior (ABTO, 2005).

A conseqüência natural da pouca oferta é a aceitação de órgãos provindos dos chamados doadores marginais, indivíduos com condições hemodinâmicas limítrofes, idade avançada ou presença de infiltração gordurosa significativa, entre outros. É de conhecimento geral que quanto pior o doador, pior o enxerto, elevando-se as chances do mesmo ser danificado durante os procedimentos de retirada e implante (De Carlis *et al*, 1996). No entanto, face à demanda crescente e à oferta limitada, o uso de fígados provenientes de doadores marginais parece justificado (Rosen *et al*, 1998; Mueller *et al*, 1999; Renz *et al*, 2005). Esta conduta expande as fronteiras dos doadores aceitos e tende a aumentar o número de transplantes efetivamente realizados, mas potencialmente expõe os receptores a riscos ainda não conhecidos ou adequadamente documentados por estudos clínicos (Mirza *et al*, 1994; De Carlis *et al*, 1996; Jiménez-Romero *et al*, 1999; Melendez & Heaton, 1999; Renz *et al*, 2005).

É evidente que se faz necessário o aprimoramento na técnica de preservação com o intuito de reduzir ao máximo o dano de isquemia/reperfusão (I/R). A afirmativa é recente: “a evolução do TxH depende, hoje, mais propriamente dos

---

---

progressos nos métodos de preservação de órgãos do que das técnicas de cirurgia e imunossupressão” (Hirokawa *et al*, 2002). Em outras palavras, evoluiu-se o bastante nos aspectos cirúrgicos e anestésicos, bem como na imunossupressão. Se há espaço para melhorar os resultados do TxH, parece que este se encontra nas técnicas de preservação de órgãos.

### **1.1. A lesão de isquemia/reperfusão**

Obrigatoriamente a realização de um TxH envolve o surgimento, em maior ou menor intensidade, de isquemia tecidual. A redução da oxigenação pode atingir o enxerto em diferentes fases do processo de troca do órgão doente pelo sadio (Carrasco *et al*, 1996; Shackleton, 1998). Denomina-se de dano de preservação ou dano de isquemia/reperfusão (I/R) os fenômenos nocivos decorrentes desse processo, sendo que a intensidade desta lesão é dependente das condições pré-mórbidas do doador, da isquemia a quente do órgão, da adequação da preservação do enxerto, da sua revascularização e ainda do ambiente pessoal do receptor (Gaffey *et al*, 1997; Strasberg, 1997; Rosen *et al*, 1999). Acredita-se que todos os enxertos sejam danificados durante o transplante (Gaffey *et al*, 1997; Wang *et al*, 1998; Cohen *et al*, 2000), sendo que a lesão das células hepáticas é detectada principalmente após a reperfusão quando o suprimento de sangue e oxigênio é restaurado (Selzner *et al*, 2003).

Quando há isquemia, por definição, há ausência de fluxo sanguíneo, caracterizando hipóxia tecidual. A hipóxia determina a diminuição do aporte de oxigênio à célula, com redução dos fosfatos ricos em energia, redução da atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ atpase e alteração na troca de água e íons. Isto promove acúmulo intracelular de íons e conseqüente influxo de água, com edema celular, glicólise em anaerobiose e queda do pH, culminando em dano isquêmico (Strasberg, 1997; Belzer & Southard, 1988; Massberg & Messmer, 1998).

Na década de 1980, foi demonstrado que a isquemia a frio é capaz de promover dano específico às células endoteliais sinusoidais (CES) (Otto *et al*, 1984; Caldwell-Kenkel *et al*, 1988; McKeown *et al*, 1988). Este achado foi confirmado por diversos estudos posteriores (Momii & Koga, 1990; Gao *et al*, 1998; Natori *et al*, 1999; Sindram *et al*, 1999). As CES danificadas tornam-se arredondadas devido a alterações na matriz extracelular e no citoesqueleto, deslocando-se para dentro do lúmen sinusoidal (McKeown *et al*, 1988; Caldwell-Kenkel *et al*, 1988; Holloway *et al*,

---



---

1990). O grau de lesão das CES tem sido correlacionado com a duração de isquemia a frio por outros autores (Caldwell-Kenkel *et al*, 1988; Holloway *et al*, 1990; Clavien *et al*, 1991). Apesar destas alterações estruturais, a maioria das CES permanece vivas durante o período de isquemia a frio. Elas morreriam rapidamente, no entanto, após a reperfusão (Imamura *et al*, 1997; Miyagawa *et al*, 2002).

A determinação da atividade das enzimas hepáticas no líquido de preservação pode evidenciar a lesão celular sofrida no período de isquemia a frio e, com isto, determinar fator prognóstico para funcionamento do órgão e viabilidade do mesmo para transplante. A liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) na solução de preservação pode ser considerada um importante índice para avaliar a qualidade da preservação do órgão (Jamieson *et al*, 1988), sendo um marcador dos danos pré-existentes ou adquiridos durante o período de isquemia (Lange *et al*, 1996a).

O dano de aquecimento ocorre no período entre a retirada do órgão do gelo e sua efetiva implantação no receptor, intervalo este que varia habitualmente entre 30 e 60 minutos. Ao contrário da isquemia a frio, a isquemia a quente é pouco tolerada, acarretando morte dos hepatócitos de forma mais rápida (Gujral *et al*, 2001; Kohli *et al*, 1999). É provável que o dano aos hepatócitos seja precedido pela morte maciça das CES (Kohli *et al*, 1999). O papel dos macrófagos residentes no tecido hepático - as células de Kupffer -, das plaquetas e leucócitos permanece em investigação na isquemia hepática a quente (Yadav *et al*, 1999).

Após 40 minutos de isquemia a quente, o interior do fígado alcança temperatura de 20°C. Uma temperatura acima de 22°C parece afetar negativamente o enxerto (Hayashi *et al*, 1998). Períodos longos de isquemia a quente, especialmente acima de 90 (Cisneros *et al*, 1991) ou 120 minutos (Strasberg, 1997), correlacionam-se diretamente com a não-função primária do enxerto. Hertl *et al* (1996) sugerem que o resfriamento da superfície do fígado deve ser mantido durante e após a retirada do órgão do doador, bem como na implantação do mesmo, visando reduzir o dano sobre o tecido hepático.

A lesão do enxerto imaginariamente cessaria no momento em que o órgão fosse reperfundido pelo sangue portal, mas este cenário é apenas teórico. A reintrodução do fluxo, ou reperfusão (As *et al*, 1999), representa ainda outro momento de potencial dano, por vezes mais notável que as fases prévias (Isozaki *et*

---

---

*al*, 1992; Ishida *et al*, 1997; Baron *et al*, 2000), sendo sua extensão dependente do grau de comprometimento do enxerto nas fases anteriores (Strasberg, 1997).

Durante a fase de isquemia o metabolismo celular anaeróbico promove degradação da adenosina para hipoxantina e conversão da xantina-desidrogenase para xantina-oxidase. Com o restabelecimento do fluxo sanguíneo, o oxigênio reage com a hipoxantina e catalisado pela xantina-oxidase produz oxirradicais que interagem de forma destrutiva com as membranas celulares (Shackleton, 1998).

O complexo isquemia/reperfusão, por conseguinte, resulta tanto da isquemia quanto da reintrodução do fluxo sanguíneo, no denominado “paradoxo do oxigênio” (Minor *et al*, 1995; Post *et al*, 1995; Arora & Gores, 1996). As lesões decorrentes do dano de preservação costumam influenciar na função do enxerto no período pós-transplante imediato e podem ser aferidas pela magnitude da elevação das enzimas hepáticas, especialmente a AST. Rosen *et al*, 1998, estudando 210 indivíduos submetidos a TxH, demonstraram que os pacientes com AST acima de 5000 UI/L nas primeiras 72 horas pós-transplante têm significativamente menor sobrevida em 1 ano que os restantes. Álvares-da-Silva (2000) em sua tese de doutorado, analisando a influência do dano de preservação na evolução pós-operatória na primeira semana, encontrou resultados semelhantes. Igualmente, a sobrevida em 1 ano foi significativamente menor no grupo de pacientes com dano de preservação acentuado.

## **1.2. O estresse oxidativo**

O fenômeno da toxicidade do oxigênio é conhecido desde o final do século XIX. No entanto, a presença de radicais livres (RL) em materiais biológicos foi identificada há apenas 50 anos (Belló-Klein, 2002).

Os RL podem ser definidos como espécies químicas capazes de existirem independentemente e que apresentem um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas do nitrogênio (ERN) incluem o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), enquanto as espécies reativas do oxigênio (ERO) mais conhecidas e estudadas incluem o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o radical hidroxil (OH<sup>-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Os RL são altamente reativos, apresentando grande instabilidade e meia-vida curta. Este é o motivo pelo qual os RL não se deslocam para longe de seu sítio de formação, interagindo com qualquer biomolécula adjacente a fim de se estabilizarem (Southorn & Powis, 1988).

---

---

Os mecanismos pelos quais as células são atacadas pelas ERO são muito complexos e ainda não perfeitamente claros. A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de ERO que é contrabalançada pelo consumo de defesas antioxidantes não enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob “estresse oxidativo” (EO), com potenciais danos (Belló-Klein, 2002; Busquets *et al*, 2002).

McCord em 1985 lançou a teoria de que os RL seriam os promotores do dano de reperfusão. A isquemia ativa as células de Kupffer. Estas, por sua vez, são a principal fonte de ERO durante o período de reperfusão (Rymasa *et al*, 1991; Jaeschke, 1998), sendo as mitocôndrias as principais geradoras intracelulares de ERO (Boveris & Chance, 1973; Teoh & Farrell, 2003).

O EO, com a formação de RL, gerado na reperfusão durante o TxH, vem sendo implicado em um aumento significativo de lesão do órgão (Minor *et al*, 1995; Busquets *et al*, 2002). Conseqüentemente, a quantificação do EO torna-se importante para inferir o grau de disfunção hepática no período pós-operatório. Entretanto, isto só pode ser realizado indiretamente, uma vez que os RL são altamente reativos e isto impede a sua estimativa direta (Burke *et al*, 2002). Várias manifestações deste processo podem ser utilizadas na estimativa do grau de EO, como a oxidação de lipídios (lipoperoxidação), a dosagem dos produtos do ON (nitrito -  $\text{NO}_2^-$  - e nitrato -  $\text{NO}_3^-$  -), a quantificação de substâncias antioxidantes e também a alteração morfológica das mitocôndrias (Belló-Klein, 2002).

A geração mitocondrial de ERO aumenta significativamente durante a reperfusão, pois os elétrons liberados pela cadeia respiratória podem ser doados diretamente ao oxigênio provindo do fluxo sanguíneo restaurado. Isto acarreta dano molecular, incluindo peroxidação lipídica, e leva a alterações morfológicas e funcionais das biomembranas e conseqüente desequilíbrio na fisiologia das células e suas organelas. Dentro deste contexto, as estruturas mitocondriais também estão expostas ao ataque pelas ERO, com dano estrutural e funcional, e eventual disfunção de importantes processos celulares, incluindo aqueles responsáveis pela síntese de trifosfato de adenosina (ATP) (Kobayashi *et al*, 1991; Hirata *et al*, 1996; Lenaz, 1998; Caraceni *et al*, 1995). Devido ao importante papel desta organela no

---

---

EO, tem surgido interesse crescente em se desenvolver técnicas que permitam a avaliação da forma e função mitocondrial (Ricchelli *et al*, 2001; Ricchelli *et al*, 2003)

A lipoperoxidação tem sido freqüentemente estudada como um dos principais mecanismos de lesão celular provocada por ERO, sendo definida como uma oxidação de lipídios poliinsaturados (Buege & Aust, 1978). Esse mecanismo caracteriza-se por ser uma reação em cadeia que dá origem a vários produtos de degradação, entre eles o malondialdeído (MDA), produto habitualmente utilizado como indicador de peroxidação lipídica (Rhoden *et al*, 1996; Lefevre *et al*, 1998). O MDA pode ser medido através da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell & Gutteridge, 1989).

O NO é uma ERN que é produzida a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Posteriormente, ele se decompõe em  $\text{NO}_2^-$  (40%) e  $\text{NO}_3^-$ , substâncias que podem ser deletérias por promoverem a oxidação e nitrosaminação de macromoléculas biológicas, causando danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), indução da lipoperoxidação lipídica, e inativação de enzimas ou proteínas estruturais (Sastry *et al*, 2002).

Durante a isquemia hepática ocorre redução nos níveis intracelulares de fosfato-dinucleotídeo-adenina-nicotinamida (NADPH) e oxigênio, substratos necessários para a atividade da NOS, com conseqüente declínio do NO. Com a reperfusão, há ativação da NOS endotelial (eNOS) pelo influxo excessivo de cálcio nas CES, com grande produção de NO (Serracino-Inglott *et al*, 2001). Entretanto, esse fenômeno é efêmero, pois o dano isquêmico provoca piora na função das CES. Os mecanismos de ação do NO não são completamente compreendidos. É interessante notar que em um modelo experimental de isquemia/reperfusão em que foi realizada a perfusão de hepatócitos isolados, o NO administrado por via exógena foi capaz de atenuar o dano celular em baixas doses, mas em altas concentrações foi lesivo às células (Farghali *et al*, 1997).

Os antioxidantes compreendem substâncias que retardam ou inibem a ação das ERO e podem ser divididos em dois principais grupos: enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase), e não enzimáticos ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e ácido úrico) (Bilzer *et al*, 1999; Llesuy, 2002).

---

---

O fígado é um órgão privilegiado quanto a defesas antioxidantes, mas a maioria destes antioxidantes localizam-se nas células do parênquima. Isto torna as células de Kupffer e as CES mais suscetíveis ao EO (Inoue, 1994).

### **1.3. As soluções de preservação**

A preservação de um órgão é a chave inicial para o sucesso do transplante. Ao preservar um órgão, objetiva-se manter sua viabilidade pelo maior tempo possível e assegurar o seu funcionamento imediato após o transplante (Belzer & Southard, 1988; Gaffey *et al*, 1997). A conservação em gelo é a técnica rotineiramente empregada para a preservação (Belzer & Southard, 1988; Strasberg, 1997), através da combinação do resfriamento da superfície do órgão e da sua perfusão com solução de preservação gelada (Hertl *et al*, 1996). Para cada 10°C de redução da temperatura ocorre paralelamente uma queda de 50% na atividade metabólica. A 1°C o metabolismo situa-se em torno de 5% do normal. Na prática, o resfriamento isolado pode preservar o fígado com segurança por até 8 horas, enquanto, em temperatura ambiente, o órgão tolera apenas 1 hora (Jaeschke, 1996). Entretanto, a hipotermia também desencadeia efeitos negativos, que incluem o edema celular, pela inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ atpase; a acidose intracelular por metabolismo anaeróbico, com acúmulo de lactato e dano celular; distúrbios na homeostase do cálcio citosólico; e, por fim, a geração de ERO (Selzner *et al*, 2003).

Desta forma, os aspectos importantes para uma solução de preservação bem sucedida incluem a baixa temperatura, a prevenção da acidose intracelular, a neutralização dos efeitos tóxicos da hipotermia, a sua capacidade de proteção contra as lesões provocadas pelos ERO, e, ainda, a manutenção do metabolismo energético da célula (Belzer & Southard, 1988; Lazzarino *et al*, 1992; Shibuya *et al*, 1997).

#### **1.3.1. A solução da Universidade de Wisconsin**

A solução de preservação da Universidade de Wisconsin (UW) é a mais utilizada pelos grupos de TxH há mais de 10 anos, tendo substituído o uso da solução Euro-Collins, até então a mais empregada (Upadhya & Strasberg, 2000). A sua síntese e introdução no mercado no final dos anos 80 é considerado um dos marcos da história do procedimento (Vera *et al*, 1993; Kahn, 1996; Cohen *et al*, 2000), uma vez que veio possibilitar uma isquemia a frio mais longa com menor

---

lesão tecidual. Outras soluções têm sido sugeridas, como a histidina-triptofano cetoglutarato (HTK), Celsior, a solução da Universidade de Medicina da China (CMU-1), mas ainda não demonstraram sua vantagem em relação à UW (Berlakovich *et al*, 2000; Janssen *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2005). O desenho da UW visa reduzir os efeitos negativos da hipotermia, combater o edema celular intersticial e a acidose, fornecendo antioxidantes e inibindo ERO, bem como prover substratos para a repleção de ATP após a reperusão (Belzer & Southard, 1988). Apesar deste desenho teórico, a solução protege principalmente o enxerto contra os danos decorrentes da fase isquêmica, sendo menos protetora na reoxigenação (Kahn, 1996). A sua principal ação – e o que lhe faz superior em relação a outras soluções - parece ser a capacidade de proteção endotelial (Clavien, 1998). De fato, as CES são o alvo inicial do dano de preservação (Natori *et al*, 1999). Na Tabela 1, está detalhado o papel dos principais componentes da solução.

**Tabela 1.** Os componentes da UW e seu papel na proteção contra o I/R.

<i>Componente</i>	<i>Atividade</i>
Lactobionato	Impermeabilizante (impede o edema celular)  Quelante de cálcio (diminui o cálcio no citosol)  Quelante de ferro (diminui o ferro no citosol)
Rafinose	Impermeabilizante (impede o edema celular)
Hidroxietilamido	Colóide (impede o edema celular)
Adenosina	Precursor da síntese de adenina-nucleotídeos
Glutationa	Remoção de RL
Alopurinol	Inibição da xantina-oxidase (reduz a produção de ânions superóxidos)
Magnésio	Cofator enzimático (transdução de energia)
Sódio e potássio	Agentes osmóticos
Dexametasona	Estabilizador de membrana
Fosfato	Efeito tampão

Modificada de Southard & Belzer, 1996

---

Uma grande desvantagem da UW é o seu preço. O frasco com 1000 mL custa em torno de US\$ 350,00 (trezentos e cinquenta dólares), sendo que em um TxH utilizam-se em média 5 litros da solução.

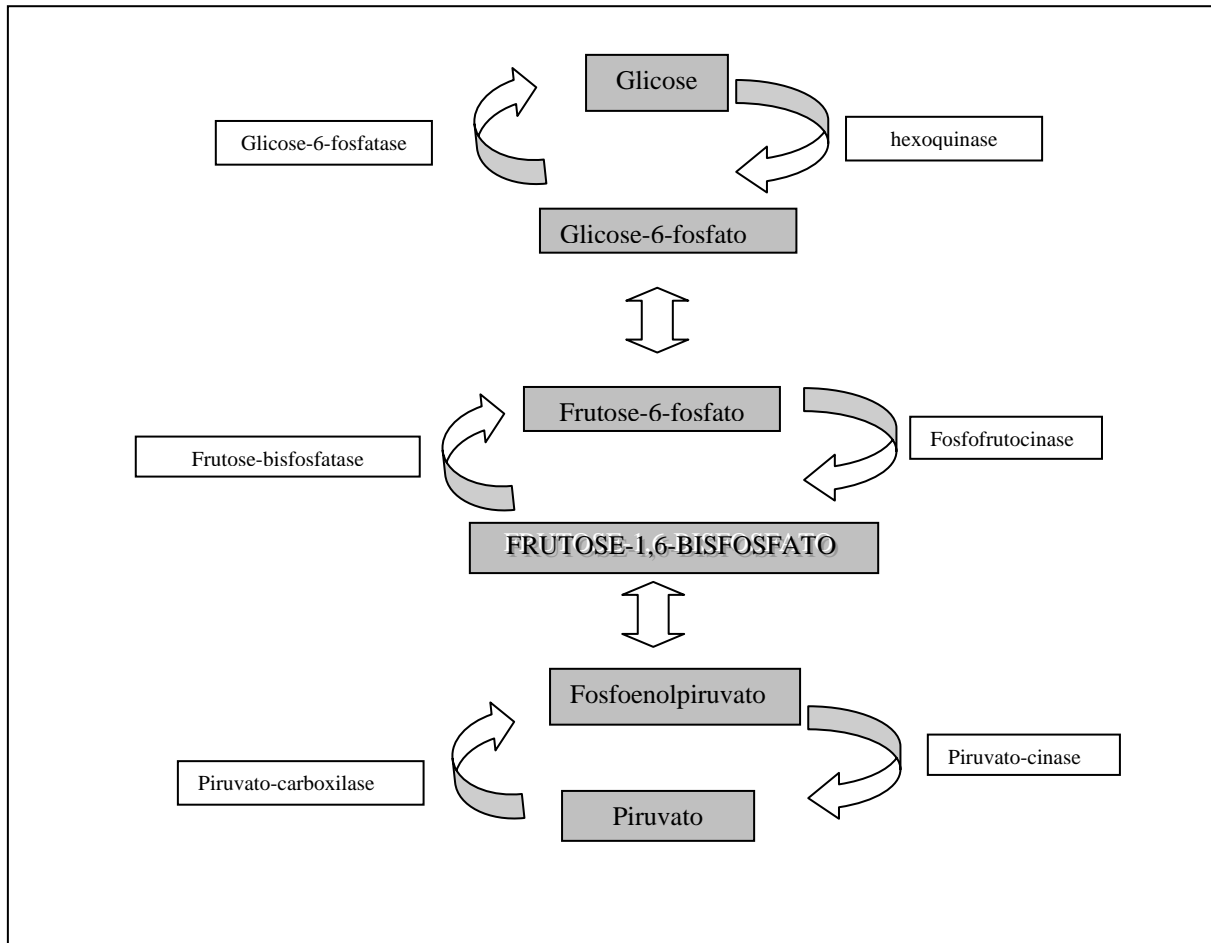
### **1.3.2. A frutose -1,6- bisfosfato**

A frutose -1,6- bisfosfato (FBP) é um intermediário na rota glicolítica (Kirtley & McKay, 1977), produzido endogenamente (Figura 1). A FBP é uma substância de baixa toxicidade que vem sendo estudada há algumas décadas como protetor celular em diversas situações patológicas (Markov *et al*, 1981a; Heckler *et al*, 1983; Didlake *et al*, 1985; Markov *et al*, 1987; Nunes *et al*, 2002). Há estudos em relação à sua capacidade de reduzir a proliferação de células T em modelo animal de transplante cardíaco (Markov *et al*, 1981b; Markov *et al*, 2002), no tratamento da sepse em ratos (Nunes *et al*, 2003) e na preservação de rins para transplante (Wächter, 1998). Ademais, a FBP foi utilizada com sucesso em outros modelos animais de isquemia/ reperfusão incluindo cérebro (Farias *et al*, 1990), coração (Lazzarino *et al*, 1991; Lazzarino *et al*, 1992), pulmão (Chu *et al*, 2002), intestino (Sun *et al*, 1990) e rim (Gregory *et al*, 1989; Eddy *et al*, 1981; Wächter, 1998).

A experiência na utilização da FBP em TxH é muito limitada. Moresco *et al* (2004b) estudaram fígados de ratos submetidos a um período de 24 horas de isquemia a frio e compararam o uso de três soluções (FBP, UW e UW acrescida de FBP), concluindo que a preservação hepática com FBP foi similar à obtida com UW. Além disso, o EO, aferido pelas TBARS, foi menor nos fígados preservados com FBP.

Em outro estudo, Iasi *et al*, 2003, comparou três soluções de preservação no TxH em porcos (a solução SC-SP- com FBP em sua composição- , Euro-Collins e UW “simplificada”) no que se refere ao EO. A solução SC-SP se associou a um menor EO no período imediato pós-transplante, refletido por menores níveis de MDA no tecido hepático.

---



**Figura 1:** Rota glicolítica. O metabolismo da glicose inicia com a fosforilação de glicose em glicose-6-fosfato (G6P), que é catalizada pela hexoquinase. Na etapa seguinte, a G6P é isomerizada em frutose-6-fosfato, que é fosforilada a FBP. Posteriormente a FBP é convertida em fosfoenolpiruvato, que sofre ação da piruvato-cinase e transfere um fosfato para o ADP, transformando-se em piruvato. Há consumo de ATP em todas etapas da rota glicolítica. (Kirtley & McKay, 1977).



---

## 2. JUSTIFICATIVA

O TxH é um procedimento de alto custo. A preservação, indispensável para o sucesso do procedimento, colabora para isto em função do preço da UW.

A busca por um líquido de preservação, que seja ao mesmo tempo tão eficaz quanto à UW, e mais barato, é um foco atraente e interessante para pesquisa.

A FBP, uma substância relativamente barata, tem demonstrado sua eficácia em modelos de sepse e isquemia, com atividade antiinflamatória e imunomoduladora. Foi estudada, com sucesso, na preservação a frio de fígados de ratos, mas não na sua reperfusão após período de isquemia a frio, que é a maneira que melhor simula o transplante hepático. Como na preservação hepática, a reperfusão é responsável por alterações mais significativas em comparação à isquemia, avaliar a aplicação da FBP neste contexto parece ser relevante.

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral:

Comparar o efeito da solução de FBP com UW após isquemia a frio e reperfusão, em relação ao dano de isquemia/reperfusão em fígados de ratos.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- a) Comparar a solução de FBP com UW após a isquemia a frio através de variáveis bioquímicas.
  - b) Comparar a solução de FBP com UW após a reperfusão através de variáveis bioquímicas e da estimativa do EO, através da mensuração das TBARS, dos produtos do NO e da atividade da catalase.
  - c) Comparar a solução de FBP com UW em relação ao dano mitocondrial após a reperfusão;
  - d) Comparar a solução de FBP com UW após a reperfusão através da avaliação anatomopatológica.
-

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenho do estudo e animais de experimentação

Foi realizado um estudo experimental em ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 300 e 450g, procedentes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os animais foram mantidos em caixas-moradia individuais, confeccionadas em *plexiglass*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem, e submetidos a ciclo normal claro/escuro de 12 h, sendo alimentados *ad libitum* com água e ração padronizada para roedores.

### 4.2. Procedimentos

A perfusão e a preservação dos fígados foram realizadas com duas diferentes soluções de preservação, a saber: a) Grupo1: UW (Viaspan® Bristol-Myers-Squibb, 1000 mL), com osmolaridade de 320 mOsm/L; e b) Grupo 2: solução de FBP, composta de 10 mmol/L de FBP dissolvida em NaCl 0,9%, com osmolaridade de 330 mOsm/L.

O procedimento experimental foi dividido em seis etapas, conforme descrito a seguir (ver Anexo 1):

#### 4.2.1. Primeira etapa (hepatectomia):

Os seguintes procedimentos foram realizados, quando necessário, com o uso de microscópio cirúrgico D.F. Vasconcelos (modelo MC.M903), sendo selecionado o aumento de 10 vezes.

a) Indução anestésica do primeiro animal (Rato A) com isoflurano a 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott) por via inalatória, em campânula de plástico transparente. Quando o animal tornava-se imóvel e com perda de reflexo de endireitamento, era colocado em decúbito ventral e imobilizado na mesa cirúrgica. A manutenção da anestesia durante todo o procedimento foi realizada pela administração do anestésico através de vaporizador calibrado;

b) Assepsia do abdômen com solução de povidine e posterior tricotomia;

c) Laparotomia via incisão longitudinal com lâmina de bisturi nº 15;

---

- 
- d) Dissecção da veia porta, com ligadura de suas tributárias, e canulação com cateter de nº 4 (Embramed®);
  - e) Dissecção da artéria hepática e reparo da mesma com fio seda 3.0;
  - f) Administração através da veia cava inferior de 250 unidades de heparina (Liquemine®, Roche);
  - g) Canulação da aorta infra-renal com cateter nº 6 (Embramed®), com ligadura distal;
  - h) Clampeamento da aorta supra-celíaca;
  - i) Infusão através da veia porta e da aorta de 125 mL da solução de preservação a 4°C, com pressão de 60 cmH<sub>2</sub>O;
  - j) Sangria do animal através da secção da veia cava superior;
  - l) Resfriamento da cavidade peritoneal com solução gelada de NaCl 0,9%;
  - m) Hepatectomia total, com ligadura da artéria hepática e da veia cava inferior;
  - n) Canulação e sutura da veia cava superior junto à emergência das veias supra-hepáticas com cateter nº 6 em mesa gelada.

#### 4.2.2 Segunda etapa (preservação a frio do fígado):

Foi realizada a preservação do fígado obtido através dos procedimentos descritos acima. O órgão foi acondicionado em recipiente plástico com 80 mL de uma das duas soluções descritas, a 4° C, por 6 horas. Foram retiradas alíquotas em 2, 4 e 6 horas para a determinação de AST, ALT e LDH (kit Liquiform® - ensaio cinético).

#### 4.2.3 Terceira etapa (preparo do rato “receptor”):

Foi feito o preparo de um segundo rato – denominado Rato B-, utilizado para a reperfusão do fígado preservado. Os seguintes procedimentos, quando necessário, foram feitos com auxílio de microscópio cirúrgico:

- a) Anestesia do Rato B com isoflurano pela mesma técnica descrita no item 4.2.1a;
  - b) Assepsia do abdômen com solução de povidine e posterior tricotomia;
  - c) Laparotomia via incisão longitudinal com lâmina de bisturi nº 15;
  - d) Dissecção da veia cava inferior e seu clampeamento abaixo da emergência das veias renais;
  - e) Dissecção da aorta e seu clampeamento acima da bifurcação das ilíacas;
-

- 
- f) Infusão de 250 unidades de heparina (Liquemine®, Roche) na veia cava inferior;
  - g) Manutenção da anestesia, com monitorização dos parâmetros hemodinâmicos e respiratórios do animal.

#### 4.2.4. Quarta etapa (reperfusão do órgão preservado):

Nesta fase foi feita a reperfusão do fígado preservado, através dos seguintes procedimentos:

- a) Retirada do fígado da solução de preservação, e infusão de 5mL de solução fisiológica em temperatura ambiente através do cateter da veia porta;
- b) Canulação da veia cava inferior do Rato B com o cateter introduzido na veia cava superior do fígado preservado - Rato A- para retorno venoso (via eferente da reperfusão);
- c) Canulação da aorta do Rato B com o cateter introduzido na veia porta do fígado preservado (via aferente da reperfusão);
- d) O fígado preservado foi colocado a uma altura de 10 cm em relação ao Rato B;
- e) Liberação da perfusão de sangue arterial através do cateter inserido na aorta, iniciando-se a reperfusão do órgão;
- f) Manutenção da reperfusão extracorpórea do fígado do Rato A, com o sangue do Rato B, por um período de 15 minutos (Figura 2).

#### 4.2.5. Quinta etapa (avaliação do I/R e EO)

Foi coletada amostra sanguínea do efluente venoso ao final dos 15 minutos de reperfusão para determinação de AST, ALT, LDH e TBARS. As dosagens de AST, ALT e LDH foram realizadas pelos mesmos métodos descritos no item 4.2.2. Para a medida das TBARS, o soro foi aquecido com ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e ácido tricloacético (TCA) 10% por 15 minutos em banho-maria, sendo a amostra posteriormente refrigerada e centrifugada. O produto corado foi quantificado por espectrofotometria em 535nm, através da técnica descrita por Halliwell & Gutteridge, 1989.

Adicionalmente, foi seccionado fragmento do fígado reperfundido para dosagem das TBARS, catalase, metabólitos do NO e análise mitocondrial.

A quantificação das TBARS no fragmento hepático foi realizada com a mesma técnica descrita para a dosagem no soro. A atividade da catalase foi

---

determinada através da reação entre tampão fosfato 50mM, de pH neutro, a peróxido de hidrogênio 0,3M, do homogeneizado do tecido hepático, com a leitura realizada em espectrofotômetro de 240nm.



Figura 2: Reperusão hepática

---

Os produtos do NO foram determinados através do método de Griess (Hevel & Marletta, 1994). Foram acrescentados 20 $\mu$ L de TCA 25% a 500 $\mu$ L de homogeneizado hepático com posterior centrifugação e neutralização com bicarbonato de potássio a 2M. A seguir, 10,5 $\mu$ L de nitrato redutase (6 unidades/mL) e 10,5 $\mu$ L de NADPH 1,1mM foram adicionados a 210 $\mu$ L do homogeneizado. Após 30 min de incubação em sala escura sob temperatura ambiente, foram incluídos 10,5 $\mu$ L de L-glutâmico desidrogenase, ácido 2-cetoglutarico 1M e cloreto de amônio 2,5M, seguido de mais 10 minutos de incubação. Adicionou-se, então, o reagente de Griess (262,5 $\mu$ L) com posterior incubação de 15 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 550nm.

As mitocôndrias foram isoladas do tecido hepático e após analisadas por espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm, utilizando lâmpada de tungstênio e um tempo de corrida de 600 s. Tal técnica foi desenvolvida durante a realização deste estudo. Em uma fase inicial do estudo, para comparação dos resultados obtidos com a reperfusão, foram isoladas e submetidas a posterior análise, as mitocôndrias dos fígados de 5 ratos controles, mortos por decapitação. Os gráficos resultantes da leitura espectrofotométrica foram utilizados como o padrão normal, sendo comparados com a representação gráfica dos grupos 1 e 2. Nos gráficos de representação destas organelas, o eixo Y representa a relação entre as bandas de amida 1 e 2 da membrana mitocondrial; enquanto o eixo X corresponde ao comprimento de onda fornecido pelo espectrofotômetro. Os gráficos são bimodais, sendo que o primeiro pico (em 1643  $\text{cm}^{-1}$ ) corresponde à amida carbonila-nitrogênio, e o segundo pico (em 1545  $\text{cm}^{-1}$ ) representa a amida nitrogênio-hidrogênio.

#### 4.2.6. Sexta etapa (análise histológica):

Nesta fase foi realizada a análise histopatológica do fígado reperfundido, feita através da coloração de hematoxilina-eosina (HE). Foram retiradas duas amostras do fígado reperfundido (lobo direito e esquerdo), fixadas em formalina a 10%, incluídas em parafina e seccionadas a 3  $\mu$ m. Posteriormente, os fragmentos foram montados sobre uma lâmina, fixados com xilol e corados. Todos os espécimes anatomopatológicos codificados foram analisados pelo mesmo patologista, sem conhecimento do grupo ao qual pertencia o material. A avaliação das lâminas se

---

---

deu através de microscópio óptico com aumentos de 40, 100 e 200X. A lesão de preservação foi definida de acordo com critérios descritos por Gaffey *et al* (1997) (Anexo 2).

#### **4.3. Tamanho da amostra**

Os parâmetros estatísticos utilizados para o cálculo do tamanho amostral compreenderam um nível de significância (alfa) de 0,05, um poder estatístico de 80%, e um tamanho de efeito padronizado igual a 1, resultando em 10 fígados para serem submetidos à reperfusão (5 em cada grupo).

#### **4.4. Análise Estatística**

Os valores das AST, ALT, LDH, TBARS, catalase e NO foram expressos em mediana e amplitude interquartílica. A análise estatística das enzimas e TBARS foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados da análise histológica foram avaliados pelo teste exato de Fisher. Valores de  $p$  inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Os dados da análise mitocondrial foram avaliados através de representação gráfica.

#### **4.5. Aspectos Éticos**

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

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

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados em *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – ILAR/EUA e Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil), em acordo com o *Ethical Guidelines for*

---



---

*Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela *International Association for the Study of Pain (IASP)*. Estas diretrizes obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*) (Goldim e Raymundo, 1997).

O projeto foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em abril/2004.

---

---

## **5. FINANCIAMENTO**

A realização deste trabalho totalizou R\$ 8.000,00 (oito mil reais), que foram financiados pelo FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) do HCPA e pelo Ministério da Saúde através da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## 6. RESULTADOS

Foram utilizados para reperfusão 10 fígados, 5 no Grupo1 (UW) e 5 no Grupo 2 (solução de FBP), perfazendo um total de 20 ratos.

A média de peso dos ratos foi de 400,4 g no Grupo 1 e de 394 g no Grupo 2.

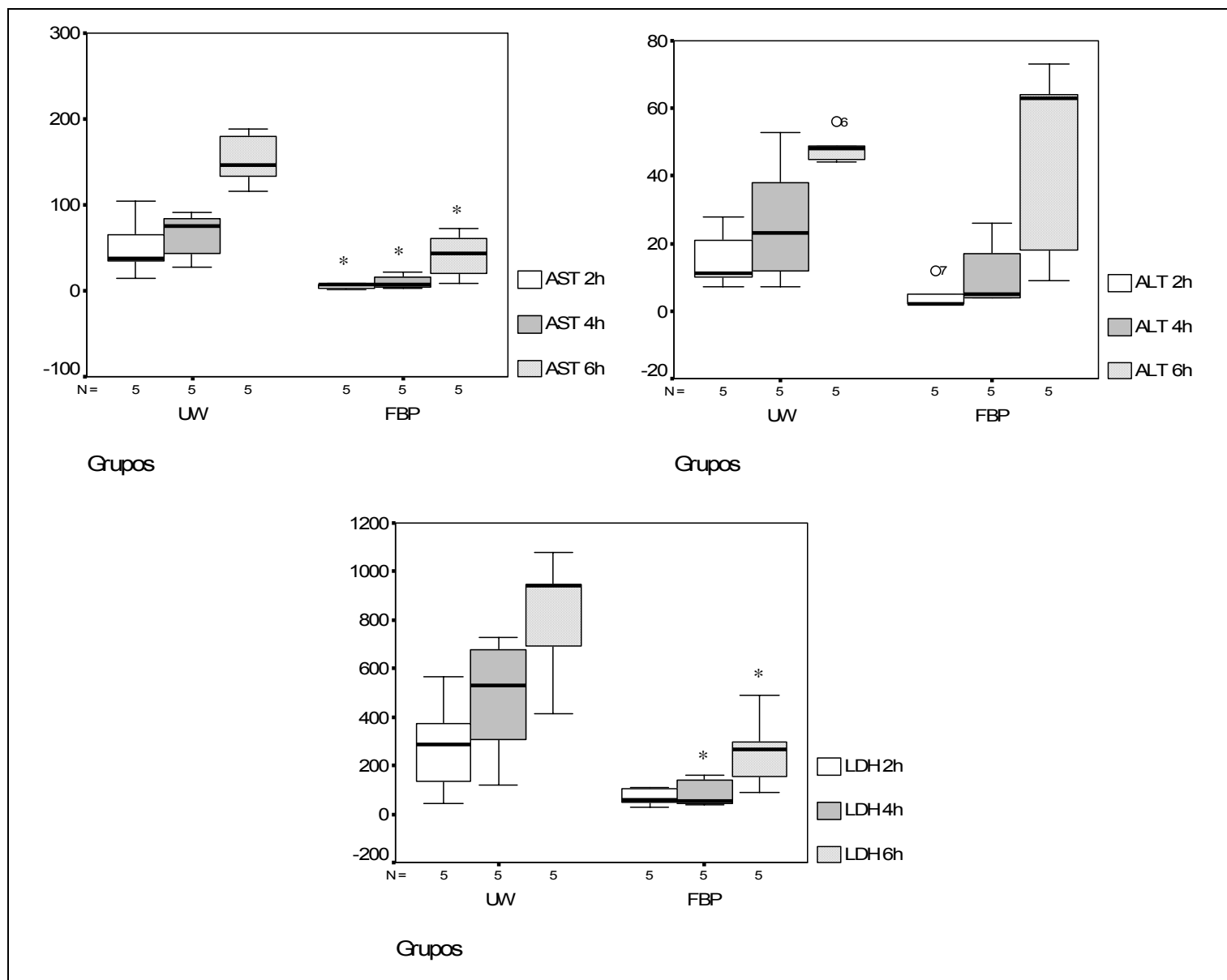
### 6.1. Preservação a frio

A mediana da dosagem de AST no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h foi significativamente maior no Grupo 1 ( $p=0,008$ ). Da mesma forma, as medidas de LDH na solução de preservação após 4 e 6 horas foram mais elevadas no grupo 1 ( $p=0,03$  e  $p=0,02$ , respectivamente). Entretanto, os níveis de LDH em 2 horas de preservação e as dosagens de ALT após 2, 4 e 6 horas foram semelhantes entre os grupos (Tabela 2, Figura 3).

**Tabela 2:** Valores de AST, ALT e LDH aferidos no líquido de preservação nos fígados preservados com UW e solução de FBP.

	<b>Grupo 1 (UW)</b> <b>(n=5)</b>	<b>Grupo 2 (FBP)</b> <b>(n=5)</b>	
<b>AST 2 h</b>	37 (25-85)	7 (2,5-7,5)	$p= 0,008^*$
<b>AST 4 h</b>	76 (35-88)	7 (3,5-19)	$p= 0,008^*$
<b>AST 6 h</b>	147 (125-183,5)	44 (15-67)	$p= 0,008^*$
<b>ALT 2h</b>	11 (8,5-24,5)	2 (2-8,5)	$p=0,06$
<b>ALT 4h</b>	23 (9,5-45,5)	5 (4-21,5)	$p=0,20$
<b>ALT 6h</b>	48 (44,5-52,5)	63 (13,5-68,5)	$p=0,70$
<b>LDH 2h</b>	289 (88,5-469)	61 (40-107)	$p=0,09$
<b>LDH 4h</b>	529 (214-704)	56 (42,5-152)	$p=0,03^*$
<b>LDH 6h</b>	941 (553,5-1010,5)	269 (121-392)	$p=0,02^*$

Os dados estão expressos como mediana e amplitude interquartilica. Análise pelo teste de Mann-Whitney, considerando-se significativo um  $p<0,05$  (\*). Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L.



**Figura 3:** Níveis de AST, ALT e LDH no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio nos Grupos 1 e 2 . Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, considerando-se significativo um  $p < 0,05$  (\*). Os dados estão representados como mediana e amplitude interquartílica. Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L.

## 6.2. Reperusão

O tempo médio de isquemia a quente foi de 57 e 58 min nos Grupos 1 e 2, respectivamente ( $p=0,7$ ). Os níveis séricos de AST, ALT e LDH após a reperusão foram significativamente maiores no Grupo 2 ( $p=0,02$ ) (Tabela 3; Figura 4). Da mesma forma, a dosagem de catalase no tecido hepático também foi mais elevada neste grupo ( $p=0,03$ ) (Tabela 4).

Os valores de TBARS (no soro pós-reperusão e tecido hepático) e de derivados do NO não diferiram entre os grupos (Tabelas 3 e 4; Figura 4).

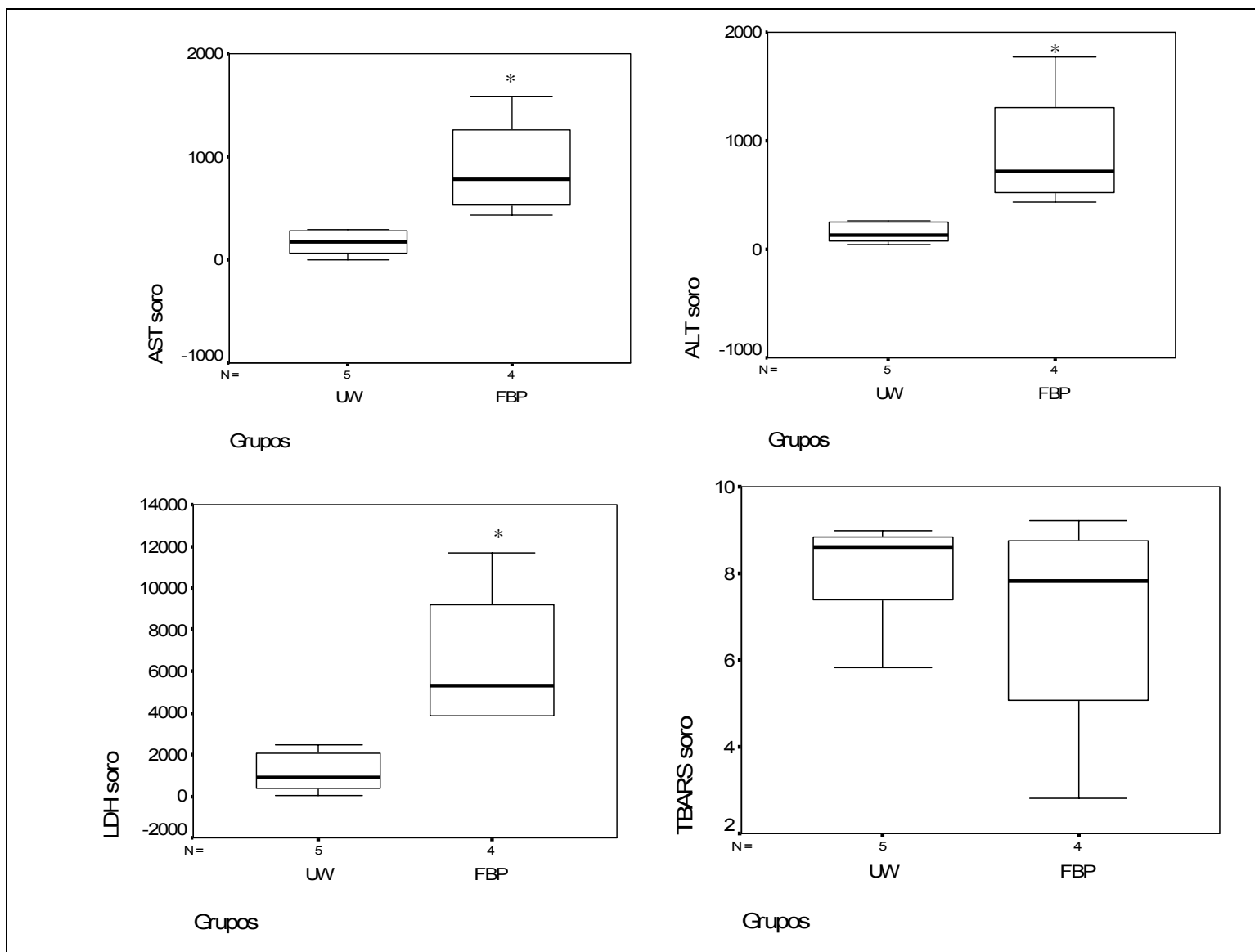
A avaliação espectrofotométrica por infravermelho das mitocôndrias isoladas do tecido hepático dos ratos decapitados e após reperusão está representada graficamente nas Figuras 5 e 6.

Analisando-se a Figura 6 percebe-se que os fígados preservados com UW mantêm o mesmo padrão de curva dos ratos controles, ou seja, o primeiro pico, no comprimento de onda de  $1643\text{cm}^{-1}$ , é maior que o segundo. Em contrapartida, no Grupo 2, se percebe uma tendência de inversão de bandas, tendo sido maior o segundo pico, demonstrando uma mudança na vibração das proteínas da membrana mitocondrial no grupo da FBP.

## 6.3. Análise anatomopatológica

Em ambos os grupos, em nenhum rato estudado houve necrose hepatocitária, neutrofilia, hiperplasia de células de Kupffer, colestase ou proliferação colangiolar. No Grupo 1 foi demonstrado balonamento hepatocitário em 80% dos fígados e esteatose em 40 %, enquanto que estes achados foram encontrados em 60% nos órgãos do Grupo 2 ( $p=0,4$  e  $p=0,5$ , respectivamente).

Em todos os fígados do Grupo 2 houve congestão sinusoidal importante, o que não se repetiu em qualquer animal do Grupo 1 (Figura 7).



**Figura 4:** Dosagens de AST, ALT, LDH e TBARS no soro pós-reperusão nos Grupos 1 e 2. Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, considerando-se significativo um  $p < 0,05$  (\*). Os dados estão representados como mediana e amplitude interquartílica. Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L; TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em nmol/g.

**Tabela 3:** Dosagens de AST, ALT, LDH e TBARS aferidos no soro pós-reperfusão.

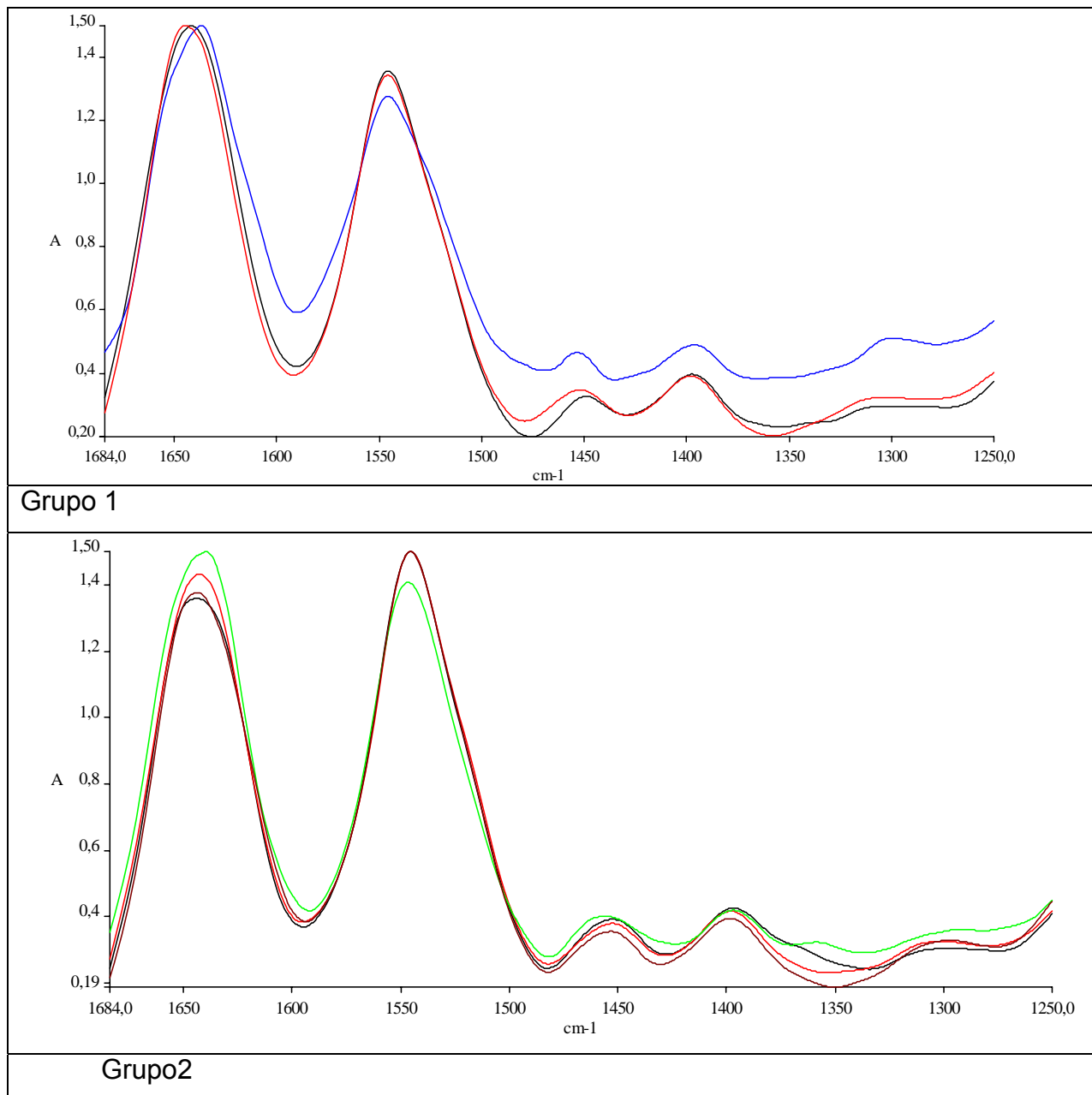
	<b>Grupo 1 (UW)</b> <b>(n=5)</b>	<b>Grupo 2 (FBP)</b> <b>(n=4)</b>	
<b>AST</b>	169 (34,5-286,5)	786,5 (485,5-1422)	<i>P= 0,02*</i>
<b>ALT</b>	128 (55,5-257)	719,5 (476,7-1540,5)	<i>P= 0,02*</i>
<b>LDH</b>	876 (205-2261)	5303,5 (3874,5-10447,2)	<i>P= 0,02*</i>
<b>TBARS</b>	8,6 (6,6-8,9)	7,8 (3,9-9,0)	<i>P=0,70</i>

Os dados estão expressos como mediana e amplitude interquartílica. Análise pelo teste de Mann-Whitney, considerando-se significativo um  $p < 0,05$  (\*). Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L.; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L.; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L.; TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em nmol/g.

**Tabela 4:** Dosagem no tecido hepático de TBARS, catalase e derivados do NO após reperfusão.

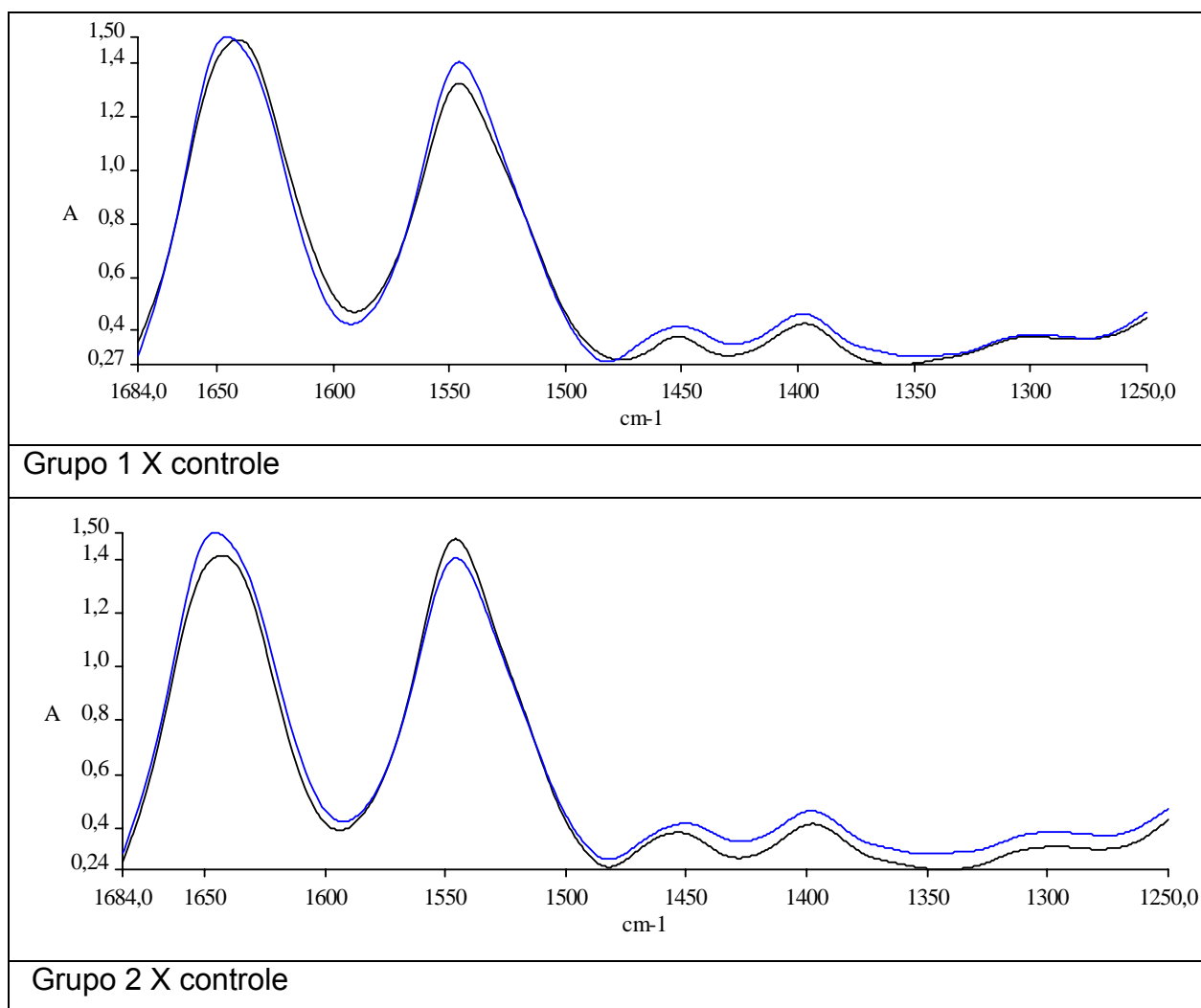
	<b>Grupo 1 (UW)</b> <b>(n=5)</b>	<b>Grupo 2 (FBP)</b> <b>(n=5)</b>	
<b>TBARS</b>	9,8 (7,4-12,7)	11,1 (7,1-14,4)	<i>p= 0,6</i>
<b>Catalase</b>	327 (255-378)	435 (350-497,5)	<i>p= 0,03*</i>
<b>Derivados NO</b>	0,06 (0,04-0,12)	0,07 (0,05-0,09)	<i>p= 1,0</i>

Os dados estão expressos como mediana e amplitude interquartílica. Análise pelo teste de Mann-Whitney, considerando-se significativo um  $p < 0,05$  (\*). Onde TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em nmol/g; NO= óxido nítrico, em nmol/mg/prot; catalase em U/mg/prot.



**Figura 5:** Avaliação espectrofotométrica das mitocôndrias isoladas do tecido hepático pós-reperusão nos Grupos 1 e 2. O eixo Y representa a relação entre as bandas de amida 1 e 2 da membrana mitocondrial; enquanto o eixo X corresponde ao comprimento de onda fornecido. As linha do gráfico expressam o conjunto de mitocôndrias isoladas de cada órgão, tendo sido analisados 3 fígados no grupo1 e 4 fígados no grupo 2. Os gráficos são bimodais, sendo que o primeiro pico (em  $1643\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde à amida carbonila-nitrogênio, e o segundo pico (em  $1545\text{ cm}^{-1}$ ) representa a amida nitrogênio-hidrogênio.





**Figura 6:** Comparação gráfica dos espectros das mitocôndrias hepáticas dos Grupos 1 e 2 (—) com o padrão das mitocôndrias hepáticas dos ratos controles (—). O eixo Y representa a relação entre as bandas de amida 1 e 2 da membrana mitocondrial; enquanto o eixo X corresponde ao comprimento de onda fornecido. Os gráficos são bimodais, sendo que o primeiro pico (em  $1643\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde à amida carbonila-nitrogênio, e o segundo pico (em  $1545\text{ cm}^{-1}$ ) representa a amida nitrogênio-hidrogênio.

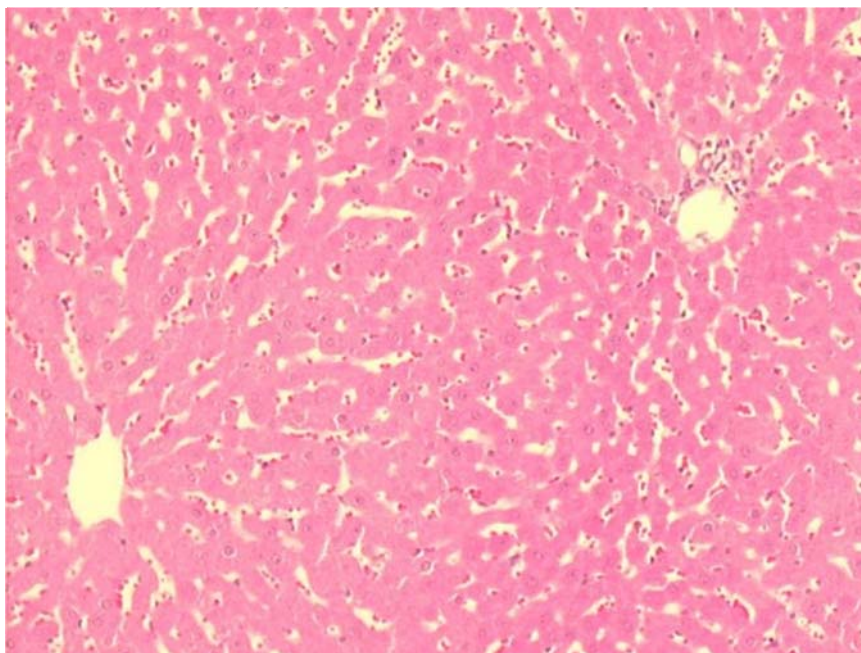


Figura 7: Aspecto do fígado após reperusão com UW. Histologia. HE, 200x.

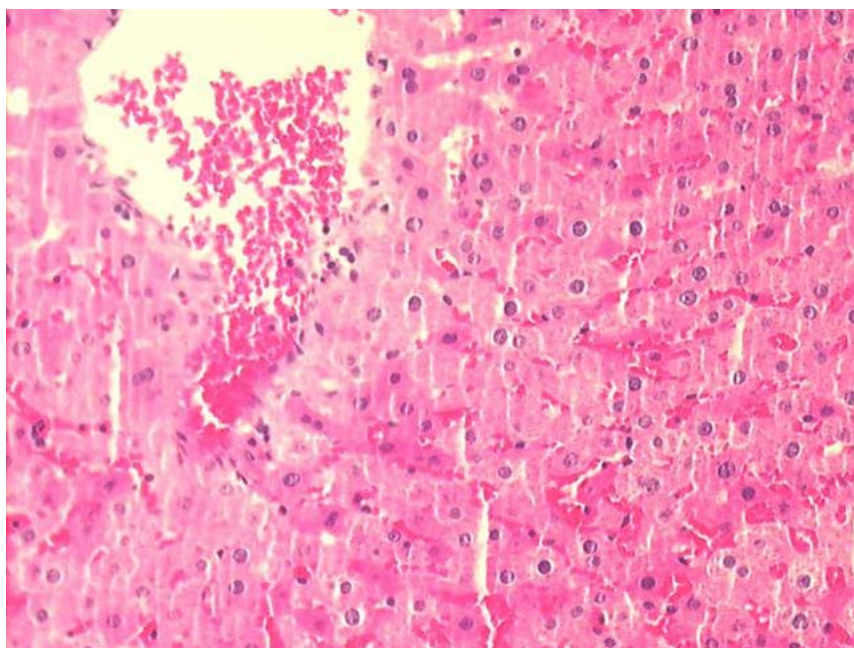


Figura 8. Aspecto do fígado após reperusão com solução de FBP. Histologia. HE, 200x.  
A seta indica os sinusóides repletos de hemácias.

---

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Em relação ao desenho do estudo

O TxH ortotópico em ratos é uma técnica muito utilizada no contexto de pesquisa. Os ratos apresentam algumas vantagens sobre outros animais devido a sua ampla viabilidade e baixo custo, apesar de ser requerido vasto treinamento técnico (Lausada *et al*, 2002). Neste trabalho, foi estudada a solução de FBP em comparação à UW na isquemia a frio durante 6 horas e após reperfusão de fígados de ratos. A solução de FBP foi escolhida em função de sua capacidade teórica de fornecer ao enxerto substrato energético para contrapor os efeitos do I/R, bem como devido a seu custo e ao fato de estar sendo utilizada em outros modelos que envolvem isquemia e restauração de fluxo sanguíneo. Outrossim, foi testada com sucesso em modelo de isquemia a frio em nosso meio, mas não após reperfusão.

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar. Durante o desenvolvimento do projeto, em razão de que seria realizada reperfusão em um animal com o sangue de outro, com o inerente risco de rejeição, foi cogitada a possibilidade de serem estudados ratos isogênicos. Estes animais são geneticamente idênticos, obtidos por cruzamento de irmãos por pelo menos vinte gerações. Através desse tipo de acasalamento quase toda a variabilidade genética é eliminada, resultando em indivíduos com características uniformes (Biotério UFPR). Se isto de fato reduziria quaisquer preocupações quanto a fenômenos imunológicos, traria outros problemas, dentre eles o alto custo destes animais e a dificuldade em obtê-los. No Brasil são escassas as fontes destes animais, e eles não são disponíveis para pronta-entrega, devendo ser encomendados. Em um estudo de mestrado, este fator seria ainda mais relevante. Foram, portanto, estudados ratos não isogênicos. Além dos motivos expostos, outros podem ser levantados, a saber: 1) o tempo de reperfusão curto talvez não fosse suficiente para desencadear rejeição. No transplante renal, em modelos que utilizam ratos Wistar, onde a pressão para a rejeição é muito maior que em TxH, podem ser dispensados os imunossupressores nos primeiros 7 dias após o procedimento (Waynforth & Flecknell, 1992); 2) os ratos Wistar são geneticamente semelhantes, devido à consangüinidade. No CREAL, o cruzamento entre os animais é aleatório.

O tempo de isquemia a frio padronizado no estudo foi de 6 horas. Poderia ser questionado se este tempo é demasiado reduzido. De fato, em TxH, o tempo de

---

---

isquemia a frio pode ser maior. Há sugestões que, com o uso de UW, a isquemia a frio pode ser de até 24 horas. Na prática, no transplante em humanos, aceitam-se órgãos com até 12 horas de isquemia. Isto porque, com períodos superiores, os resultados do transplante são piores (Adam *et al*, 1992; Sanchez-Urdazpal *et al*, 1992; Petrowsky *et al*, 1995; Kahn 1996; Klar *et al*, 1997). Moresco *et al* (2004b) estudaram a isquemia a frio em fígados de ratos por período de 24 horas. No desenvolvimento deste estudo cogitou-se 12 horas de isquemia a frio. Este período, no entanto, foi inviabilizado pelo horário de funcionamento da UEA do HCPA, que fecha à noite. O tempo intermediário de 6 horas, então, foi adotado como padrão.

O modelo experimental de reperfusão hepática utilizado é original, desenvolvido pelo nosso grupo, como substitutivo ao transplante completo. Este método apresenta alguns aspectos peculiares que merecem destaque: 1) O experimento contemplou isquemia a frio, isquemia a quente e reperfusão, ao contrário de outros estudos que avaliaram o I/R após isquemia normotérmica (Kawano *et al*, 1992; Karwinski *et al*, 1994; Helling *et al*, 1995; Reinders *et al*, 1996; Heijnen *et al*, 2001; Friend *et al*, 2001; Imber *et al*, 2002; Khandoga *et al*, 2003; Cursio *et al*, 2005). Não se pode esquecer que isto se distancia em muito do que ocorre em um transplante verdadeiro. Embora a hipotermia mantenha o órgão viável por um período maior (Belzer & Southard, 1988; Gaffey *et al*, 1997), sendo essencial para a preservação de órgãos, por outro lado ela ocasiona efeitos negativos sobre o enxerto (Selzner *et al*, 2003). Desta forma, parece ser essencial a avaliação do efeito das soluções de preservação em modelos que incluam período de isquemia a frio; 2) O fígado preservado do Rato A foi reperfundido com o sangue provindo da circulação sistêmica do Rato B, que poderia ser considerado o “rato receptor”. Este é um detalhe que qualifica o modelo utilizado, uma vez que simula um transplante real. Alguns estudos realizam a perfusão do órgão através de um líquido com características similares ao sangue e infundido através das denominadas “máquinas de perfusão” (Lutterová *et al*, 2001; Cheng *et al*, 2005), o que não parece ser o mais adequado. Talvez, antes de se constituir em uma prova de sofisticação, isto pode ser fruto da incapacidade técnica de se conseguir a reperfusão; 3) O sangue utilizado para a perfusão do órgão preservado foi de fonte arterial, provindo da aorta do “rato receptor”, situação esta que contrasta com o cenário do transplante, onde o enxerto é reperfundido com sangue portal. Durante a fase de desenvolvimento do modelo, a veia cava foi testada como via aferente da reperfusão. Porém, não houve sucesso. O sangue parecia não ter força suficiente para reperfundir o órgão.

---

---

Provavelmente isto ocorria devido à canulação do vaso com cateter longo e de fino calibre, levando à diminuição de pressão durante o trajeto até o fígado. Com isto, fez-se a opção pela aorta como fonte do sangue. Esta artéria, por outro lado, apresenta fluxo sanguíneo alto e de elevada pressão, o que trouxe preocupações acerca do seu potencial de lesão do enxerto. Em analogia com o raciocínio prévio, a introdução de cateter longo e fino na artéria, e a posterior elevação do órgão “doador” em 10 cm em relação ao nível do “receptor” foi capaz de reduzir a pressão de perfusão e a probabilidade de dano ao órgão. Ainda durante o desenvolvimento deste método, foram analisadas lâminas histopatológicas de fragmentos de fígados reperfundidos. Não houve indícios de dano endotelial ou hepatocelular, o que forneceu alguma segurança na utilização deste modelo.; 4) Um ponto importante é que o tempo de perfusão do órgão foi de 15 minutos. Podem ser levantadas questões sobre a adequação deste pequeno período. Por certo, quando o modelo foi planejado ele o foi para uma reperfusão mais demorada, em torno de 60 minutos. No entanto, era essencial que o “rato receptor” fosse mantido em boas condições hemodinâmicas durante todo o procedimento. Isto foi possível apenas ao ser padronizado o tempo de 15 minutos. Por outro lado, a falta de estudos similares ao estudo em questão, autorizam a que seja utilizado este método. Ademais, considerando que a síndrome isquemia/reperfusão pode também ser definida como uma redução de 30% na pressão arterial média nos primeiros 5 minutos de restauração de fluxo sanguíneo ao órgão (Ayoub & Ahmed, 2003), o período de reperfusão adotado neste trabalho parece adequado. É interessante notar que em modelos de reperfusão com máquinas, e sem sangue, o tempo utilizado fica em torno de 60 a 120 minutos (Caraceni *et al*, 2005; Cheng *et al*, 2005; Stadler *et al*, 2005).

Cabe ainda ser discutido o tipo de anestesia. A droga escolhida como anestésico foi o isoflurano, administrado via inalatória, contrastando com muitos trabalhos que utilizam anestésicos por via intraperitoneal. A técnica inalatória requer aparelhagem adequada e sofisticada, além do risco de extravasamento do anestésico através das conexões, tornando o pesquisador suscetível. Por outro lado apresenta significativas vantagens, como a facilidade de administração, a concomitante oferta de oxigênio através do vaporizador e a maior segurança devido a possibilidade do constante ajuste de doses conforme os parâmetros respiratórios do animal (Waynforth & Flecknell, 1992).

---

---

Em relação a escolha das variáveis, dosamos AST, ALT e LDH, conhecidos marcadores de necrose hepatocelular (Davern & Scharschmidt, 2002). Durante a isquemia a frio do fígado doado para transplante, a liberação destas enzimas no líquido de preservação está relacionada ao grau de dano hepático mesmo quando ainda não ocorreram alterações anatomopatológicas (Lange *et al*, 1996b). Da mesma forma, elevados níveis de aminotransferases no período imediato pós-transplante se correlacionam com a não função primária do enxerto (Rosen *et al*, 1998).

O EO vem sendo apontado como um dos principais fatores responsáveis pelo dano ao enxerto. Desta forma, a quantificação dos RL e substâncias antioxidantes torna-se um importante parâmetro para inferir a viabilidade do órgão pós-transplante (Biasi *et al*, 1995; Schauer *et al*, 2001; Burke *et al*, 2002; Grezzana *et al*, 2004) . Sua aplicação, contudo, ainda é restrita à pesquisa, não sendo empregada na prática clínica. A maioria dos trabalhos simplificam a estimativa do EO na determinação de apenas uma variável, o MDA (Iasi *et al*, 2003; Moresco *et al*, 2004a e b). Neste estudo, entretanto, utilizamos 4 parâmetros (TBARS, produtos do NO, atividade da catalase e análise das mitocôndrias isoladas do tecido hepático) com a intenção de se estimar o EO de forma mais fidedigna. É importante ressaltar neste momento que o método de análise das mitocôndrias utilizado foi desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) durante a realização deste estudo. Pesquisadores da PUC possuem experiência no emprego de espectrofotometria com raios infravermelhos no estudo celular. Sabendo do importante papel das mitocôndrias no EO, se resolveu estudar estas organelas através deste método.

Por fim, foram realizadas biópsias hepáticas no término da reperfusão. O principal papel da análise histológica neste estudo consiste em demonstrar a efetividade da reperfusão, uma vez que 15min não é suficiente para desencadear infiltrado inflamatório e outras alterações sugestivas de dano de preservação. De fato, é conhecido que biópsias hepáticas realizadas imediatamente após o transplante demonstram apenas balonamento hepatocelular com leve predominância centrolobular (Gaffey *et al*, 1997).

---

## 7.2. Em relação aos resultados durante isquemia a frio

No presente estudo, a solução de FBP exerceu uma maior ação protetora sobre o órgão durante as 6 horas de preservação a frio em comparação à UW. Esta afirmativa baseia-se nos menores níveis de AST e LDH no líquido de preservação. Não houve, no entanto, diferença entre os dois grupos em relação à ALT. Deve-se considerar, por outro lado, que numa fase de dano agudo ao fígado, os níveis de AST costumam alterar-se mais precocemente que os de ALT. Isto é o que ocorre em TxH (Bao *et al*, 1994; Rosen *et al*, 1998). Estes dados, de certa forma, apresentam-se mais otimistas em relação à FBP, quando comparados a achados de estudos semelhantes (Moresco *et al*, 2004a; Moresco *et al*, 2004b). Nestes trabalhos, FBP e UW foram equivalentes na preservação aos frio de fígados de ratos em 12 e 24h.

O chamado índice de reperfusão (REP) é determinado através da fórmula  $REP = [AST + ALT + LDH] \div 3$ , onde os níveis bioquímicos são os valores máximos dos primeiros 7 dias após o transplante (Viebahn *et al*, 1998). Embora até este momento se esteja falando apenas de isquemia a frio, caso fosse tomada a liberdade do cálculo do REP nos fígados preservados com UW e solução de FBP, seriam obtidos os seguintes valores com UW e solução de FBP, respectivamente: em 2 horas, 112,3 e 23,3; em 4 horas, 209,3 e 22,7; e em 6 horas, 378,7 e 125,3. É notável que a preservação com FBP, por este critério, tenha sido significativamente melhor que com UW ( $p < 0,0001$ ).

Vários outros estudos em isquemia e reperfusão de outros órgãos demonstram a atenuação do I/R após a administração exógena de FBP (Markov, 1986; Sun *et al*, 1990; Sano *et al*, 1995; Lazzarino *et al*, 1992), resultados semelhantes ao trabalho em questão.

A razão pela qual a FBP exógena protege as células da destruição ainda é obscuro. Talvez seja o fato de que a substância agiria como um intermediário glicolítico capaz de fornecer ATP ao entrar na célula (Lazzarino *et al*, 1991, De Oliveira *et al*, 1992). No entanto, não há evidências diretas de que a membrana celular seja permeável à FBP (Hardin & Roberts, 1994), sendo propostas, por esta razão, teorias alternativas para os seus efeitos protetores. Galzigna & Rigobello (1986) sugeriram que a FBP atua como um estabilizador de membrana por

---

influenciar na entrada de cálcio e outros cátions (Cattani *et al*, 1980; Hassinen *et al*, 1991). Outro estudo questiona se o mecanismo pelo qual a FBP reduz a lesão tecidual associada à isquemia, choque e dano tóxico, seria relacionado à sua capacidade de aumentar a utilização anaeróbia de carboidratos e de inibir a geração de ERO pelos neutrófilos (Markov *et al*, 1980). Além disso, Hirokawa *et al*, 2002, demonstrou que a adição de FBP nas soluções de preservação foi útil em proteger as células de Kupffer, fontes do EO. O desenho do presente estudo não permite que sejam feitas considerações acerca dos mecanismos envolvidos. Talvez fosse possível alguma conclusão em relação a isto caso estivessem disponíveis valores referentes ao EO, como TBARS, catalase e produtos do NO no líquido de preservação. Entretanto, dificuldades técnicas impediram a sua determinação. Moresco *et al*, 2004b, detectaram que TBARS no líquido de preservação foi menor no grupo de FBP em 24 h de isquemia a frio. De qualquer forma, não se poderia chegar a uma conclusão mais definitiva, posto que neste último estudo o EO foi avaliado apenas a partir de um único parâmetro.

### **7.3. Em relação aos resultados após reperfusão**

Após a reperfusão os resultados foram diversos daqueles obtidos durante a preservação a frio. Ou seja, os níveis de AST, ALT e LDH mostraram-se significativamente mais elevados no grupo da FBP. O cálculo do REP após a reoxigenação também apresentou resultados diferentes em relação aos obtidos após a isquemia a frio. Nos fígados preservados com UW o REP foi de 391, enquanto que nos preservados com solução de FBP foi de 2269,8 ( $p < 0,0001$ ). O REP foi concebido para avaliação do I/R com variáveis obtidas até o sétimo dia pós-transplante. Via de regra, no entanto, os valores mais elevados são aqueles do primeiro dia, imediatamente após o maior insulto da isquemia e da reperfusão. De fato, não se pode falar em REP neste estudo, sem novamente ser feita a ressalva de que este índice não se aplica exatamente a esta situação. Álvares-da-Silva, em 2000, estudou, em humanos, o I/R, encontrando correlação entre o REP e a biópsia de preservação. Considerando que os achados referentes à biópsia são alterações bastante precoces, pode-se inferir que o REP calculado logo após a reperfusão tem a capacidade de refletir, sim, o I/R. Neste contexto, fica ainda mais claro que foi pior a reperfusão nos fígados preservados com FBP.

É intrigante notar que, pelos resultados deste estudo, a UW, pelo menos até o momento em relação aos parâmetros bioquímicos, tenha se mostrado mais eficaz

---



---

na proteção do enxerto após a reoxigenação. São achados que vão de encontro ao descrito em outros estudos, em que a UW teria seu principal efeito na isquemia a frio e não na reperfusão (Brass *et al*, 1993; Kahn, 1996; Lutterová *et al*, 2001).

Não há como comparar estes resultados com outros trabalhos, pela inexistência de publicações que estudem a solução de FBP num contexto de isquemia a frio seguida de reperfusão em fígados no que tange a parâmetros bioquímicos.

Em relação ao EO, as dosagens de TBARS no soro e tecido e dos produtos do NO no tecido não diferiram entre os grupos. Estes achados sugerem que o EO teria sido semelhante após a reperfusão dos fígados preservados tanto com UW, quanto com FBP. Porém, a atividade da catalase no homogeneizado hepático mostrou-se significativamente maior no grupo da FBP. O aumento da atividade deste agente antioxidante endógeno pode ser o reflexo de uma maior geração de ERO. Quando se analisa a composição da UW, vê-se que dentre seus constituintes encontra-se um agente antioxidante, a glutathiona. Teria sido este o motivo para que não houvesse uma maior atividade de catalase nos fígados preservados com esta solução? De fato, a atividade da catalase pode vir a somar-se aos dados bioquímicos, atestando uma menor capacidade da FBP na proteção do enxerto após a reperfusão.

Estes achados são contrários ao de interessante estudo que analisou o emprego de FBP em cultura de hepatócitos (Kim *et al*, 2003). Neste estudo, publicado em *Gastroenterology*, os autores avaliaram I/R com e sem FBP. Concluíram que no grupo em que foi utilizada a solução houve menor necrose hepatocitária. Previamente, já havia sido demonstrado que o conteúdo de ATP intracelular condiciona, após isquemia/reperfusão, o surgimento de necrose celular ou apoptose (Teoh & Farrell, 2003). Quanto maior o conteúdo de ATP, maior a apoptose, e, por conseguinte, menor recrutamento de linfócitos e dano tecidual.

A representação gráfica da leitura espectrofotométrica das mitocôndrias isoladas do tecido hepático demonstrou que os fígados preservados com UW apresentaram a mesma conformação protéica da membrana mitocondrial quando comparados ao grupo controle. Nos fígados preservados com solução de FBP, a análise dos gráficos sugere que tenha havido alteração na estrutura. Pouco mais pode ser dito acerca destes achados, uma vez que esta representação somente

---

---

demonstra que houve modificação da estrutura mitocondrial. Se esta modificação o foi para melhor ou para pior, o método não tem como avaliar. No entanto, quando somados estes achados com as variáveis bioquímicas e de EO, parece ser um claro indício de que esta alteração na membrana mitocondrial seja negativa, reflexo de lesão pelos RL. É sabido, e vale ressaltar, que as mitocôndrias não são apenas fonte de ERO, mas também um de seus principais alvos.

Quanto aos aspectos anatomopatológicos, não houve sinais de dano de preservação em nenhuma das lâminas estudadas. É provável que este achado esteja relacionado ao reduzido tempo de reperfusão. Neste sentido, Jaeschke, em 1996, sugeriu que ocorra adesão dos neutrófilos à parede dos sinusóides apenas 4 a 5 horas após a restauração do fluxo sanguíneo. Entretanto, a biópsia pós-reperfusão em seu modelo original, e empregado no presente estudo, foi descrita para ser realizada logo após a mesma (Gaffey *et al*, 1997). Há que se fazer a ressalva de que esta forma de aferição do I/R foi desenvolvida para aplicação em humanos. Por certo que há um período superior a 15 minutos entre a anastomose vascular que restaura o suprimento de oxigênio e o término da anastomose biliar, quando é realizada habitualmente a biópsia.

Na lesão de isquemia/reperfusão há duas fases distintas. Em um primeiro momento após a reperfusão, persiste a ausência de fluxo. Esta fase prolonga a hipóxia, com conseqüente redução da fluidez sanguínea e aumento da resistência microvascular. O fluxo reduzido e a resistência aumentada resultam em oclusão capilar. O pH celular diminui, o que leva à deformação das células sanguíneas e ao surgimento de microtrombos capilares. Paralelamente ocorre edema das CES levando à oclusão capilar e maior aumento da resistência microvascular, induzindo agravamento da hipóxia e com isto ainda mais notável dano tecidual. Após a reintrodução do fluxo sanguíneo, os leucócitos rapidamente aderem-se aos sinusóides lesados e contribuem para o dano (Clavien *et al*, 1993; Gao *et al*, 1998; Natori *et al*, 1999; Sindram *et al*, 1999; Miyagawa *et al*, 2002). No presente estudo, todos os fígados preservados com solução de FBP apresentaram congestão sinusoidal significativa, em contraste aos fígados preservados com UW. Este fenômeno pode estar relacionado ao maior I/R com FBP. Assim, a congestão sinusoidal observada na histologia dos fígados preservados com solução de FBP pode ser a demonstração de uma lesão significativa das CES durante a preservação a frio, que se reflete em bloqueio do fluxo sanguíneo por trombos capilares após a reperfusão.

---

---

#### 7.4. Limitações do estudo

Dentro das especificações deste estudo, e à luz das indagações que ainda são feitas acerca do tema, podem ser levantadas, infelizmente, algumas limitações:

1) Os animais utilizados foram de linhagem não isogênica, o que possibilitaria o desencadeamento de rejeição. Esta, no entanto, não foi demonstrada em qualquer caso;

2) O tempo de perfusão de 15 minutos talvez seja a principal limitação, pois, em um período curto de reperfusão, é possível que sejam documentadas apenas alterações muito precoces do I/R. A fase inicial, as primeiras 2 h após a reperfusão, é caracterizada principalmente pelo EO. Já na fase tardia, 6 a 48 horas após a reperfusão hepática, e não contemplada neste estudo, é que costuma ocorrer a reação inflamatória mediada pelos neutrófilos (Teoh & Farrell, 2003). Assim, tem-se com este modelo dados restritos do dano I/R. Isto explica o foco na avaliação do EO neste estudo;

3) Não foi aferida a pressão de perfusão hepática no modelo de reperfusão. Existem sensores que podem ser utilizados com esta finalidade, mas estes apresentam sensibilidade para detectar o fluxo sanguíneo apenas quando aplicados na própria parede do vaso. Com isto, não se dispõe de dados relativos à circulação sanguínea do modelo. Entretanto, a reperfusão adequada obtida especialmente nos fígados de ratos preservados com UW atesta a efetividade do sistema;

4) Não foi monitorizada a produção de bile durante a reperfusão. Este é um parâmetro importante da função hepática e depende da qualidade dos hepatócitos e da microcirculação (Misra *et al*, 2003). Logo na fase inicial da reperfusão, a produção de bile apresenta forte correlação com os níveis de ATP intracelular. Dessa forma, quanto menor a depleção de ATP durante a isquemia a frio, maior será a secreção de bile após a reperfusão (Kamiike *et al*, 1985). Houve produção efetiva de bile no modelo, mas não tendo sido planejado seu controle no início do estudo, este dado foi perdido;

5) A análise mitocondrial com espectrofotometria por infravermelho consiste em um dado adicional referente ao EO. Entretanto, ainda é um método em

---

---

desenvolvimento, sem referenciais de normalidade na literatura. Neste estudo, na tentativa de determinar um padrão, foram estudados 5 ratos controles, o que certamente é um número pequeno. Além disso, a alteração encontrada na conformação da membrana mitocondrial nos fígados preservados com FBP precisa ser confirmada e detalhada com microscopia eletrônica.

### **7.5. Possíveis aplicações futuras do estudo**

Considerando o desenho deste estudo, seus achados e suas limitações, podem ser aventadas as seguintes aplicações práticas:

- 1) O modelo de reperfusão desenvolvido poderá ser utilizado em outros estudos experimentais para avaliação do I/R em fígados de ratos;
  - 2) A análise espectrofotométrica das mitocôndrias deverá ser melhor avaliada e poderá vir a ser um método alternativo à microscopia eletrônica;
  - 3) Como a FBP mostrou-se mais eficaz que a UW na preservação a frio, pode ser cogitado o seu papel como um dos constituintes de um líquido de preservação. Certamente, esta hipótese deve ser testada em outros estudos.
-

---

## 8. CONCLUSÕES

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

- 1) O dano de isquemia/reperfusão foi significativamente maior nos fígados de ratos preservados com solução de FBP em comparação àqueles preservados com UW;
  - 2) A solução de FBP foi superior à UW na preservação a frio de fígados de ratos, através da avaliação por variáveis bioquímicas;
  - 3) Houve maior dano após a reperfusão nos fígados preservados com solução de FBP em comparação àqueles preservados com UW, através da avaliação por variáveis bioquímicas;
  - 4) Não houve diferença entre os grupos em relação ao estresse oxidativo gerado pós-reperfusão, quando aferido pelas TBARS e pelos produtos do óxido nítrico;
  - 5) Houve maior ativação dos sistemas antioxidantes nos fígados preservados com solução de FBP em comparação àqueles preservados com UW, refletida pela maior expressão da enzima catalase;
  - 6) Houve modificação na conformação estrutural da membrana mitocondrial de fígados de ratos preservados com solução de FBP, quando comparada a ratos controles;
  - 7) Não houve modificação na conformação estrutural da membrana mitocondrial de fígados de ratos preservados com UW, quando comparada a ratos controles;
  - 8) Não foram encontradas alterações anatomopatológicas sugestivas de dano de isquemia/reperfusão após a restauração do fluxo sanguíneo em fígados de ratos preservados com ambas as soluções;
-

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM R, BISMUTH H, DIAMOND D, DUCOT B, MORINO M. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet*. 1992; 340: 1373-6.

ÁLVARES-DA-SILVA MR. A influência do dano de isquemia/reperfusão na função do enxerto e na evolução imediata em pacientes submetidos a transplante hepático- o papel da biópsia de reperfusão. Dissertação de Doutorado, 2000. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia.

ARORA AS, GORES GJ. The role of metals in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Semin Liver Dis*. 1996; 16: 31-8.

AS AB, LOTZ Z, TYLER M, KAHN D. Impact of early arterialization in the liver allograft. *Transplant Proc*. 1999; 31: 406-7.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. Disponível em <http://www.abto.com.br>. Último acesso em outubro de 2005.

ASSOCIAÇÃO ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO. Disponível em <http://www.aeeh.org/>. Último acesso em outubro de 2005.

AYOUB T; AHMED K. Liver transplant anesthesia: an update. *Curr Opin Organ Transplant*. 2003; 8:252-7.

BAO YM, ADAM R, SAMUEL D, CASTAING D, BISMUTH H. Influence of high aminotransferase levels on rejection in liver transplantation. *Transplant Proc*. 1994; 26: 259-60.

BARON PW, SINDRAM D, HIGDON D, HOWELL DN, GOLTFRIED MR, TUTTLE-NEWHALL JE, CLAVIEN PA. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2000; 6: 407-12.

BELLÓ-KLEIN A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI N.P. *Estresse Oxidativo e antioxidantes*. Editora da ULBRA, Canoas, 2002, pp. 15-9.

BELZER F, SOUTHARD J. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988; 45: 673

BERLAKOVICH GA, WINDHAGER T, PUNZ A, POKORNY H, LANGER F, LOSERT UM, MUEHLBACHER F, STEINIGER R. Storage of the rat liver with Celsior in relation to hepatic energy metabolism [abstract]. *Liver Transpl*. 2000; 6: C-10.

---

- 
- BIASI F, BOSCO M, CHIAPPINO I, CHIARPOTTO E, LANFRANCO G, OTTOBRELLI A, MASSANO G, DONADIO PP *et al.* Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19: 311-7.
- BILZER M, PAUMGARTNER G, GERBES AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology.* 1999; 117: 200-10.
- BIOTÉRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Disponível em <http://www.bio.ufpr.br/unidades/bioterio/>. Último acesso em outubro de 2005.
- BOSCH X. Spain rejects “social” reasons to deny access to transplantation. *Lancet.* 1999; 354: 1454
- BOVERIS A, CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973;134:707–16.
- BRASS CA, CRAWFORD JM, NARCISO JP, GOLLAN JL. Evaluation of University of Wisconsin cold-storage solution in warm hypoxic perfusion of rat liver: the addition of fructose reduces injury. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1455-63.
- BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978, 52: 302-9.
- BURKE A, FITZGERALD GA, LUCEY MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation.* 2002; 74: 217-21.
- BUSQUETS J, SERRANO T, FIGUERAS J, RAMOS E, TORRAS J, RAFECAS A, FABREGAT J, XIOL X, LAMA C, IBANEZ L, JAURRIETA E. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc.* 2002; 34: 252-3.
- BUSUTTIL RW, FARMER DG, YERSIZ H, HIATT JR, McDIARMID SV, GOLDSTEIN LI, SAAB S, HAN S *et al.* Analysis of long-term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single-center experience. *Ann Surg.* 2005; 6: 905-16.
- CALDWELL-KENKEL J, THURMAN R, LEMASTERS JJ. Selective loss of non parenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation.* 1988; 45: 834.
- CARACENI P, RYU H S, VAN THIEL DH, BORLE AB. Source of oxygen free radicals produced by rat hepatocytes during post-anoxic reoxygenation. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1268: 249.
- CARACENI P, DOMENICALI M, MARIA PERTOSA A, MAIOLINI E, GRATAGLIANO I, PRINCIPE A, PALASCIANO G, TREVISANI F, *et al.* The nutritional status modulates preservation-reperfusion injury in rat fatty liver. *J Surg Res.* 2005; 127: 190-6.
-

---

CARRASCO L, SANCHEZ-BUENO F, SOLA J, RUIZ JM, RAMIREZ P, ROBLES R, RODRIGUEZ JM, PARRILLA P. Effects of cold ischemia time on the graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. *Transplantation*. 1996; 61: 393-6.

CATTANI L, COSTRINI R, CERILLI C. Fructose -1,6- diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. *Agressologie*. 1980; 21: 263-4.

CHENG Y, LIU YF, CHENG DH, LI BF, ZHAO N. Evaluation of CMU-1 preservation solutions using an isolated perfused rat liver model. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 2522-5.

CHU S, CHANG D, WANG D, CHEN Y, HSU C, HSU K. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med*. 2002; 30: 1605-9.

CISNEROS C, GUILLEN F, GOMEZ R, GUTIERREZ J, VORWALD P, MONTERO A, MORENO E. Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft. *Transplant Proc*. 1991; 23:1976.

CLAVIEN PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology*. 1998; 28: 281-5.

CLAVIEN PA, HARVEY PRC, SANABRIA JR, CYWES R, LEVY GA, STRASBERG SM. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver allograft. Mechanisms and effects. *Hepatology*. 1993; 17:131-42.

CLAVIEN PA, MORGAN GR, SANABRIA JR, PETRUNKA C, LEVY GA, ROBERT P, HARVEY C, STRASBERG SM. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation*. 1991; 52: 412-7.

COHEN AJ, BURCZYNSKI FJ, ROSSER BG, LIPSCHITZ J, MINUK GY. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials intracellular calcium concentrations and outcome following liver transplantation. *Am J Surg*. 2000; 179: 154-60.

CURSIO R, FILIPPA N, MIELE C, COLOSETTI P, AUBERGER P, VAN OBBERGHEN E, GUGENHEIM J. Fas ligand expression following normothermic liver ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 2005; 125: 30-6.

DAVERN TJ, SCHARSCHMIDT BF. Biochemical liver tests. In: FELDMAN M, FRIEDMAN LS, SLEISENGER MH. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis , management. Saunders 7 th ed, Philadelphia, 2002 , pp. 1227-1229.

DE CARLIS L, SANSALONE CV, RONDINARA GF, COLELLA G, SLIM AO, ROSSETTI O, ASENI P, DELLA VOLPE A, *et al*. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int*. 1996; 9 Suppl 1: S414-7.

DE OLIVEIRA JR, ROSA JL, AMBROSIO S, BARTRONS R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology*. 1992; 15: 1147-53.

---



---

DIDLAKE RH, KIRCHNER KA, LEWIS J, BOWER JD, MARKOV AK. Protection from ischemic renal injury by fructose -1,6- diphosphate infusion in the rat. *Circ Shock*. 1985; 16: 205-12.

EDDY LJ, CHAMBERS D, HONIG S, DOWNEY JM. Lack of a direct metabolic effect of fructose-1,6-diphosphate in ischemic myocardium. *Am J Physiol*. 1981; 241: H576-H582.

FARGHALI H, ZIDEK Z, HYNIE S. Effects of nitroprusside as a nitric oxide donor on anoxia/reoxygenation and D-galactosamine hepatic injuries: a study in perfused hepatocytes. *Physiol Res*. 1997; 46: 363-9.

FARIAS LA, SMITH EE, MARKOV AK. Prevention of ischemic-hypoxic brain injury and death in rabbits with fructose-1,6-diphosphate. *Stroke*.1990; 21: 606-13.

FRIEND PJ, IMBER C, ST PETER S, LOPEZ I, BUTLER AJ, REES MA. Normothermic perfusion of the isolated liver. *Transplant Proc*. 2001; 33: 3436-8.

GAFFEY MJ, BOYEL JC, TRAWEEK ST, ALI MA, REZEIG M, CALDWELL SH, IEZZONI JC, McULLOUGH C, *et al*. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1997; 25: 184-9.

GALZIGNA L, RIGOBELLO M. Proton and potassium fluxes in rat red blood cells incubated with sugar phosphates. *Experientia* 1986; 42: 138-9.

GAO W, BENTLEY RC, MADDEN JF, CLAVIEN PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of injury in rat liver transplantation. *Hepatology*. 1998; 27:1652-60.

GOLDIM JR, RAYMUNDO MM. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2 ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas /Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação; 1997.p 30.

GREGORY GA, YU ACH, CHAN PH. Fructose-1,6-bisphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989; 9: 29-34.

GREZZANA T.J.M, CORSO C.O, ZANOTELLI M.L, MARRONI C.A, BRANDÃO A.B.M, SCHLINDWEIN E, LEIPNITZ I, MEINE M.H.M, *et al*. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after inicial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplant Proc*. 2004; 36: 843-5.

GUJRAL J, BUCCI T, FARHOOD A, JAECHKE H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001; 33: 397-405.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2 th edition. Clarendon Press. Oxford 1989.

HARDIN C.D, ROBERTS T.M. Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994; 267: H2325-H2332.

---

---

HASSINEN IE, NUUTINEN EM, ITO K, NIOKA S, LAZZARINO G, GIARDINA B, CHANCE B. Mechanism of the effect of exogenous fructose-1,6-bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation*. 1991; 83: 584-93.

HAYASHI M, SHIMIZU Y, MURAKAMI M, KUSANO M. Rewarming injury of the graft liver in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 1998; 30: 3692-3.

HECKLER FR, MARKOV AK, JONES W. Effects of fructose 1-6 diphosphate on canine hind limbs subjected to tourniquet ischemia. *J Hand Surg*. 1983; 8: 622-3.

HEIJNEN BH, VAN VEEN SO, STRAATSBURG IH, VAN GULIK YM. Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 265-8.

HELLING TS, WOGAHN BM, OLSON SA, EVANS LS, REDDY BR, VANWAY C. The effect of prostaglandin E1 on liver adenine nucleotides and cytoplasmic enzymes in a porcine model of normothermic hepatic ischemia. *Hepatology*. 1995; 22: 1554-9.

HERTL M, HOWARD TK, LOWELL JA, SHENOY S, ROBERT P, HARVEY C, STRASBERG SM. Changes in liver core temperature during preservation and rewarming in human and porcine liver allografts. *Liver Transpl Surg*. 1996; 2: 111-7.

HEVEL JM, MARLETTA MA. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 250-8.

HIRATA Y, TAGUCHI T, NAKAO M, YAMADA T, HIROSE R, SUITA S. The relationship between the adenine nucleotide metabolism and the conversion of xanthin oxidase enzyme system in ischemia– reperfusion of the rat small intestine. *J Pediatr Surg*. 1996; 31: 1199– 204.

HIROKAWA F, NAKAI T, YAMAUE H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation*. 2002; 74: 779-83.

HOLLOWAY C, HARVEY P, STRASBERG S. Viability of sinusoidal lining cells in cold-preserved rat liver allografts. *Transplantation*. 1990; 49: 225-9.

IASI M, FAVERO SG, SOLER WV, IASI MSF, CORDOVANY TBN, RITTES JC, SZUTAN LA, ROLIN EG *et al*. Oxidative stress in liver transplantation with special reference to Santa Casa-SP solution: a preclinical study. *Transplant Proc*. 2003; 35: 1134-5.

IMAMURA H, BRAULT A, HUET PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology*. 1997; 25: 664-71.

IMBER CJ, ST PETER SD, CENARRUZABEITIA I, PIGOTT D, JAMES T, TAYLOR R, MCGUIRRE J, HUGHES D. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation*. 2002; 73: 701-9.

INOUE M. Protective mechanisms against reactive oxygen species. In: ARIAS IM, FAUSTO N, JAKOBY WB, SCHACHTER D, SHAFRITZ DA. *The liver: biology and pathobiology*, New York: Raven, 1994. pp. 443-59.

---

- 
- ISHIDA T, YARIMIZU K, GUTE DC, KORTHUIS RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock*. 1997; 8: 86-94.
- ISOZAKI H, ADAM R, GIGOU M, SZEKELY AM, SHEN M, BISMUTA H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg*. 1992; 79: 310-3.
- JAESCHKE H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol*. 1996; 25: 774-80.
- JAESCHKE H. Mechanism of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatol*. 1998; 21: 402-8.
- JAMIESON NV, LINDELL S, SUNDBERG R, SOUTHARD JH, BELZER FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation*. 1988; 46: 512-6.
- JANSSEN H, JANSSEN PH, BROELSCH CE. UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl*. 2004; 10: 1514-23.
- JIMENEZ ROMERO C, MORENO GONZALEZ E, COLINA RUIZ F, PALMA CARAZO F, LOINAZ SEJUROLA C, RODRIGUEZ GONZALEZ F, GONZALEZ PINTO I, GARCIA GARCIA I, *et al*. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation*. 1999; 68: 572-5.
- JULAPALLI VR, KRAMER JR, EL-SERAG HB. Evaluation for liver transplantation: Adherence to AASLD referral guidelines in a large veterans affairs center. *Liver Transpl*. 2005; 11: 1370-8.
- KAHN D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomatic biliary strictures (correction of structures)? *HPB Surg*. 1996; 9: 113-5.
- KAMIIKE W, NAKAHARA M, NAKAO K, KOSEKI M, NISHIDA T, KAWASHIMA Y, WATANABE F, TAGAWA K. Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation*. 1985; 39: 50-5.
- KARWINSKI W, GARCIA R, HELTON WS. Allopurinol dose is important for attenuation of liver dysfunction after normothermic ischemia: correlation between bile flow and liver enzymes in circulation. *Res Exp Med (Berl)*. 1994: 321-7.
- KAWANO K, KIM YI, GOTO S, KAI T, SHIMADA T, KAMADA N, KOBAYASHI M. FK 506 ameliorates normothermic liver ischemia in rats by suppressing production of tumor necrosis factor. *Transpl Int*. 1992; 5 (Suppl1): S665-9.
- KHANDOGA A, ENDERS G, LUCHTING B, AXMANN S, MINOR T, NILSSON U, BIBERTHALER P, KROMBACH F. Impact of intransischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35: 901-9.
- KIM JS, QIAN T, LEMASTERS J. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 2003; 124: 494-503.
-

---

KIRTLEY ME, McKAY M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem.* 1977; 18: 141-9.

KLAR E, BREDT M, KRAUS T, ANGELESCU M, MEHRABI A, SENNINGER N, OTTO G, HERFARTH C. Early assessment of reperfusion injury by intraoperative quantification of hepatic microcirculation in patients. *Transplant Proc.* 1997; 29: 362-3.

KOBAYASHI H, NONAMI T, KUROKAWA T, SUGIYAMA S, OZAWA T, TAKAGI H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion induced liver injury in rats. *J Surg Res.* 1991; 51: 240-4.

KOHLI V, MADDEN JF, BENTLEY RC, CLAVIEN PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology.* 1999; 116: 168-78.

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; 67:1099-105.

LANGE R, ERHARD J, RAUEN U, DE GROOT H, EIGLER FW. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation,* 1996; 62: 1255-9.

LANGE R, ERHARD J, RAUEN U, HELLINGER A, DE GROOT H, EIGLER FW. Injury to hepatocytes and non-parenchymal cells during the preservation of human livers with UW or HTK solution: a determination of hepatocellular enzymes in the effluent perfusate for preoperative evaluation of the transplant quality. *Transpl Int,* 1996; 9 Suppl 1: S472-6.

LAUSADA NR, GONDOLESI GE, ORTIZ E, DREIZZEN E, RAIMONDI JC. Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2002; 32: 63-70.

LAZZARINO G, NUUTINEN ME, TAVAZZI B, CERRONI L, DIPIERRO D, GIARDINA B. Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated Langendorff-perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1991; 23:13.

LAZZARINO G, TAVAZZI B, DI PIERRO D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose -1,6- bisphosphate. *Free Radic Res Commun.* 1992; 16: 325-39.

LEFEVRE G, BELJEAN-LEYMARIE M, BEYERLE F, BONNEFONT-ROUSSELOT D, CRISTOL JP, THEROND P, TORREILLES J. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris).* 1998; 56: 305-19.

LENAZ G. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta.*1998; 1366: 53.

LLESUY SF. Introducción y especies activas de oxígeno. In: MARRONI N.P. *Estresse Oxidativo e antioxidantes.* Editora da ULBRA, Canoas, 2002, pp. 21-32.

---

---

LUTTEROVÁ M, KUKAN M, VAJDOVÁ K, KUBA D, MISLANOVÁ C, KEBIS A, DANNINGER F, MRÁZ P. Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbecks Arch Surg*. 2001; 386: 31-7.

MARKOV AK. Hemodynamic and metabolic effects of fructose 1-6 diphosphate in ischemia and shock- experimental and clinical observation. *Ann Emerg Med*. 1986; 15: 1470-7.

MARKOV AK, OGLETHORSE NC, BLACKIE TM, LEHAN PH, HELLEMS HK. Hemodynamic, electrocardiographic, and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am Heart J*. 1980; 100: 639-46.

MARKOV AK, OGLETHORPE N, YOUNG DB, HELLEMS HK. Irreversible hemorrhagic shock- treatment and cardiac pathophysiology. *Circ Shock*. 1981; 8: 9-19.

MARKOV AK, RAYBURN TS, TALTON DS, NETHERLAND DE, MOORE C, HEATER B, COHEY HH. Fructose -1,6- diphosphate alone and in combination with cyclosporine potentiates rat cardiac allograft survival and inhibits lymphocyte proliferation and interleukin-2 expression. *Transplantation*. 2002; 74: 1651-4.

MARKOV AK, TERRY JW, WHITE TZ, DIDLAKE RH, HELLEMS HK. Increasing survival of dogs subjected to hemorrhagic shock with fructose 1-6 diphosphate. *Surgery*. 1987; 102: 515-27.

MARKOV AK, TURNER MD, OGLETHORPE N, HELLEMS HK. Fructose 1-6 diphosphate: an agent for treatment of experimental endotoxin shock. *Surgery*. 1981; 90: 482-8.

MASSBERG S, MESSMER K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1998; 30: 4217-23.

McCORD JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985; 312:159-63.

McCORMICK A, SULTAN J. Liver transplantation--patient selection and timing. *Med J Malaysia*. 2005; 60 SupplB: 83-7.

McKEOWN C, EDWARDS C, PHILLIPS M, HARVEY P, PETRUNKA C, STRASBERG S. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988; 46: 178-91.

McMASTER P, VADEYAR H. Criteria for liver graft allocation in the era of organ shortage. *Acta Chir Belg*. 2000; 100: 285-7.

MELENDEZ HV, HEATON ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation*. 1999; 68: 469-71.

MINOR T, YAMAGUCHI Y, ISSELHARD W. Effects of taurine on liver preservation in UW solution with consecutive ischemic rewarming in the isolated perfused rat liver. *Transpl Int*. 1995; 8: 174-9.

---

---

MIRZA D, GUNSON B, DA SILVA R, MAYER A, BUCKELS J, McMASTER P. Policies in Europe on “marginal quality” donor livers. *Lancet*. 1994; 344: 1480-3.

MISRA S, VARTICOVSKI L, ARIAS IM. Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285: G316-24.

MIYAGAWA Y, IMAMURA H, SOEDA J, MATSUNAGA K, MOCHIDA S, FUJIWARA K, MATSUYAMA Y, KAWASAKI S. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver. *Liver Transpl*. 2002; 8: 370-81.

MOMII S, KOGA A. Time-related morphological changes in cold storage rat livers: a comparison of Euro-Collins solution with UW solution. *Transplantation*. 1990; 50: 745.

MORESCO RN, SANTOS RCV, ALVES FILHO JCF, OLIVEIRA JR. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage after 12 and 36 hours of rat liver preservation. *Transplant Proc*. 2004; 36: 2593-5.

MORESCO RN, SANTOS RCV, ALVES FILHO JCF, CUNHA AA, REIS C, REICHEL CL, OLIVEIRA JR. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplant Proc*. 2004; 36: 1261-4.

MORIKA D, TAKADA Y, KASAHARA M, ITO T, URYUHARA K, OGAWA K, EGAWA H, TANAKA K. Living donor liver transplantation for noncirrhotic inheritable metabolic liver diseases: impact of the use of heterozygous donors. *Transplantation*. 2005; 80: 623-8.

MUELLER AR, PLATZ KP, KRAUSE P, STEINMULLER T, GLANEMANN M, NEUMANN U, LOBECK H, NEUHAUS P. Is the use of marginal liver grafts justified? *Transplant Proc*. 1999; 31: 401-2.

NATORI S, SELZNER M, VALENTINO KL, FRITZ LC, SRINIVASON A, CLAVIEN PA, GORES GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation*. 1999; 68: 89-96.

NORMAN, DJ. Allocation of livers for liver transplantation. Ethics and politics. *Clin Liver Dis* 1997; 1: 281-6.

NUNES FB, GRAZIOTTIN CM, ALVES FILHO JC, LUNARDELLI A, PIRES MG, WACHTER PH, DE OLIVEIRA JR. An assessment of fructose -1,6- bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res*. 2003; 47: 35-41.

NUNES FB, SIMOES PIRES MG, FARIAS ALVES FILHO JC, WACHTER PH, RODRIGUES DE OLIVEIRA J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose -1,6- bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med*. 2002; 30: 2069-74.

---

---

ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES. Disponível em <http://www.donacion.organos.ua.es/ont/>. Último acesso em outubro de 2005.

OTTE JB, GOYET JV, REDING R. Liver transplantation for hepatoblastoma: Indications and contraindications in the modern era. *Pediatr Transplant*. 2005; 9: 557-65.

OTTO G, WOLL H, DAVID H. Preservation damage in liver transplantation: electron microscopic findings. *Transplant Proc*. 1984; 46: 178.

PETROWSKY H, DIPPE B, GECK P, LINCKE M, KOENING J, BHATTI S, WENISH HJ, ENCKE A. Do oxygen radicals play a role in primary dysfunction of transplanted livers following preservation in University of Wisconsin solution? *Transplant Proc*. 1995; 27: 729-31.

POST S, RENTSCH M, GONZALEZ AP, PALMA P, OTTO G, MENGER MD. Importance of the first minutes of reperfusion in hepatic preservation injury. *Transplant Proc*. 1995; 27: 727-8.

REINDERS ME, VAN WAGENSYELD BA, VAN GULIK TM, FREDERIKS WM, CHAMULEAU RA, ENDERT E, KLOPPER PJ. Hyaluronic acid uptake in the assessment of sinusoidal endothelial cell damage after cold storage and normothermic reperfusion of rat livers. *Transpl Int*. 1996; 9: 446-53.

RENZ JF, KIN C, KINKHABWALA M, JAN D, YARADARAJAN R, GOLDSTEIN M, BROWN RJr, EMOND JC. Utilization of extended donor criteria liver allografts maximizes donor use and patient access to liver transplantation. *Ann Surg*. 2005; 242: 556-63.

RHODEN EL, MAURI M, PETTEFFI L, BELLÓ-KLEIN A, KALIL AN, PEREIRA-LIMA L, RHODEN CR. Efeito da reperfusão na lesão tecidual causada por radicais livres em ratos submetidos à isquemia hepática. *GED* 1996; 15: 49-52.

RICCHELLI F, BEGHETTO C, GOBBO S, TOGNON G, MORETTO V, CRISMA M. Structural modification of the permeability transition pore complex in resealed mitochondria induced by matrix-entrapped disaccharides. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 410: 155-60.

RICCHELLI F, CAMERIN M, BEGHETTO C, CRISMA M, MORETTO V, GOBBO S, SALVATO B, SALET C *et al*. Disaccharide modulation of the mitochondrial membrane fluidity changes induced by the membrane potential. *IUBMB Life*. 2001; 51: 111-6.

ROSEN HR, MARTIN P, GOSS J, DONOVAN J, MELINEK J, RUDICH S, IMAGAWA DK, KINKHABWALA M, *et al*. Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation. *Transplantation*. 1998; 65: 68-72.

ROSEN HR, MADDEN JP, MARTIN P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology*. 1999; 29: 365-70.

RYMSA B, WANG J, De GROOTVH. O<sub>2</sub> release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*. 1991; 206: G602-G607.

---

---

SÁNCHEZ-URDAZPAL L, GORES GJ, WARD EM, MAUS TP, WAHLSTROM HE, MOORE SB, WIESNER RH, KROM RA. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1992; 16: 49-53.

SANO W, WATANABE F, TAMAI H, FURUYA E, MINO M. Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology*. 1995; 108: 1785-92.

SASTRY KV, MOUDGAL RP, MOHAN J, TYAGI JS, RAO GS. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. *Anal Biochem*. 2002; 306: 79-82.

SELZNER N, RUDIGER H, GRAF R, CLAVIEN P-A. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 2003; 125: 917-36.

SERRACINO-INGLOTT F, HABIB NA, MATHIE RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 2001; 181: 160-6.

SHACKLETON CR. Upregulation of major histocompatibility complex-expression under ischemic conditions in experimental models. *Transplant Proc*. 1998; 30: 4264-6.

SHAUER RJ, BILZER M, KALMUK S, GERBES AL, LEIDERER R, SCHILDBERG FW, MESSMER K. *Transplantation*. 2001; 72: 1692-9.

SHIBUYA H, OHKOHCHI N, SEYA K, SATOMINI S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ase activity in the perfused rat liver after cold preservation. *Transplant Proc*. 1997; 29: 1328-30.

SINDRAM D, KOHLI V, MADDEN J, CLAVIEN PA. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation*. 1999; 68: 136-40.

SOUTHARD JH; BELZER FO. Principles of organ preservation. In: Busuttil RW; Klintmalm GB, eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996, pp. 379-85.

SOUTHORN PA, POWIS G. Free radicals in medicine. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc*. 1988; 63: 381-9.

STADLER M, NUVENS V, SEIDEL L, ALBERT A, BOOGAERTS JG. Effect of nutritional status on oxidative stress in an ex vivo perfused rat liver. *Anesthesiology*. 2005; 103: 978-86.

STEINBROOK R. Public solicitation of organ donors. *N Engl J Med*. 2005; 353: 441-4.

STRASBERG SM. Preservation injury and donor selection: it all starts here. *Liver Transpl Surg*. 1997; 3(5 Suppl 1): S1-7.

SUN J, FARIAS LA, MARKOV AK. Fructose-1,6-disphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and deaths in rats. *Gastroenterology*. 1990; 98: 117-26.

---



---

TEOH NC, FARREL GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 891-902.

UNITED NETWORK FOR ORGAN SHARING. Disponível em <http://www.unos.org/>. Último acesso em outubro de 2005.

UPADHYA GA, STRASBERG SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/ tryptophan/ ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*. 2000; 31: 1115-22.

VERA, SR, RIELY, CA, BURRELL, MI, KOFF, RS. *American Gastroenterological Association Clinical Teaching Project: Liver Transplantation*, 1993, pp. 1-58.

VIEBAHN R, THOMA M, KINDER O, SCHENK M, LAUCHART W, BECKER HD. Analysis of intragraft adhesion molecules and their release in clinical liver transplantation: impact of reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1998; 30: 4257-9.

WÄCHTER P.H. Efeito da fructose 1,6 bisfosfato na preservação de rins de ratos. Tese de doutorado- Faculdade de Medicina PUCRS- Curso Pós-Graduação em Medicina, 1998.

WANG L, FLORMAN S, ROAYAIE S, BASILE J, ZHANG ZY, MACHAC J, BOROS P, MILLER CM. Differential in vivo recovery of sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. *Transplantation*. 1998; 66: 573-8.

WAYNFORTH HB, FLECKNELL PA. Experimental and surgical technique in the rat. Second edition. Academic Press Hacount Brace Favanovich. New York. 1992.

WIESNER RH. Current indication, contraindications and timing for liver transplantation. In: Busuttil RW; Klintmalm GB eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996.

YADAV SS, HOWELL DN, STEEBER DA, HARLAND RC, TEDDER TF, CLAVIEN PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology*. 1999; 29: 1494-1502.

---

**ANEXO 1.** Fluxograma do procedimento experimental





---

**ANEXO 3.****TITLE PAGE****Fructose 1-6 bisphosphate vs UW solution for organ preservation in rat liver ischemia-reperfusion model**

Raquel Scherer de Fraga, M.D.<sup>1</sup>, Cleber Rosito Pinto Krueel, M.D.<sup>2</sup>, Stela Maria Mota, M.D.<sup>1</sup>, Siluê Dal Molin, M.D.<sup>1,5</sup>, Gabriel Guinsburg Barlem M.D.<sup>1</sup>, Glauber Gasperin<sup>6</sup>, José Mateus Pra Guaragna<sup>7</sup>, Rodrigo Fagundes Medeiros<sup>7</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski, M.D.<sup>3</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira, PhD.<sup>7</sup>, Mário Reis Álvares-da-Silva, M.D., PhD.<sup>1,2,4</sup>

From the <sup>1</sup> Post-Graduate Program in Gastroenterology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; the <sup>2</sup> Liver Transplantation Unit, the <sup>3</sup> Division of Patology, Experimental Animal Unit, the <sup>4</sup> Division of Gastroenterology, the <sup>5</sup> Division of Anesthesiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>6</sup> Student of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Medical School; the <sup>7</sup> Biophysical Laboratory, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Keywords:** transplantation, reactive oxygen specimens, antioxidants, ischemia-reperfusion injury, preservation solutions

---

---

## FOOTPAGE

### Contact Information

Address reprint request to: Mário Reis Álvares-da-Silva, Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Division of Gastroenterology- Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre RS90035-003, Brazil. E-mail: mras@terra.com.br; Phone: 55 51 21018307 Fax: 55 51 21018001

Raquel Scherer de Fraga – rschfraga@terra.com.br

Cleber Rosito Pinto Kruehl- ckruel@plugin.com.br

Stela Maria Mota- smmota@terra.com.br

Silue Dal Molin – silue@terra.com.br

Gabriel Guinsburg Barlem- ggbarlem@bol.com.br

Glauber Gasperin – glauber\_gasperin@yahoo.com.br

Jarbas Rodrigues de Oliveira- jarbas@puccs.br

Carlos Thadeu Schmidt Cerski – thadeu@kcm.com.br

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ATP, adenosine triphosphate;  $Ca^{2+}$ , calcium ion ; DNA, deoxyribonucleic acid; FBP, fructose 1-6 biphosphate; GSH, glutathione; LDH, lactate dehydrogenase; LT, liver transplantation; NO, nitric oxide derivatives ; OS, oxidative stress; ROS, reactive oxygen species; SEC, sinusoidal endothelial cells; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; UW, University of Wisconsin.

---

### **Financial Support**

Supported in part by grants from the Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and Ministry of Education (CAPES Foundation) Brazil.

---

**ABSTRACT**

Fructose- 1,6- biphosphate (FBP) has been shown to exert therapeutic effects in septic shock and in models of ischemia-reperfusion in organs other than the liver. This study compared FBP and UW solution during cold storage and reperfusion. Adult male Wistar rats were randomly assigned into two experimental groups according to different preservation solution: UW group and FBP group. Biochemical measurements of AST, ALT and LDH were performed on samples of the cold storage solution at 2, 4 and 6 hours of preservation. After 6 h cold storage, an isolated rat liver perfusion model was applied to reperfuse the liver for 15 min. After this period, the reperfusion system was interrupted and blood samples were taken for measurements of AST, ALT, LDH and TBARS. Hepatic fragments were processed for histological studies and also for determination of TBARS, catalase and nitric oxide derivatives (NO). At 2, 4 and 6 hours of preservation, AST and LDH release in storage solution was lower in the FBP group, but after reperfusion, serum levels of AST, ALT and LDH were higher in this group, as well as catalase activity was. TBARS and NO measurements were comparable between the both groups. No signs of injury preservation were observed in any liver biopsy, but sinusoidal congestion was universally present in livers preserved with FBP solution. In conclusion, FBP solution showed a protective effect for the preservation of rat livers during cold storage, but failed preventing the organ injury post-reperfusion.

---



---

Liver transplantation (LT) is the standard treatment for acute and chronic end-stage liver diseases,<sup>1</sup> and optimal preservation of the allograft is essential to reduce post-ischemic organ dysfunction.<sup>2,3</sup> There are some important features for a successful preservation that include hypothermia, prevention of intracellular acidosis, protection from oxidative stress, and maintenance of cell energy metabolism.<sup>2,4,5</sup> Storage solutions were designed in order to prevent post-transplant tissular damage. By now, preservation of liver grafts is preferably achieved by the University of Wisconsin (UW) solution, that is considered the actual standard.<sup>6</sup> On theory, it contains agents that may prevent cells from swelling during cold ischemic storage, and stimulate recovery of normal metabolism upon reperfusion by augmenting the antioxidant capacity of the organs or by stimulating high-energy phosphate generation after reperfusion.<sup>2,4,5</sup> However, UW solution appears to prevent mainly against the ischemic injury, with small effect in the reperfusion.<sup>7</sup> Additionally, UW solution has the disadvantage of high viscosity and high price, that encourages the production of new compounds with lower cost to effect ratios.

Fructose 1-6 bisphosphate (FBP), a glycolytic high-energy intermediate,<sup>8</sup> has been shown to exert substantial therapeutic effects in a variety of clinical conditions, as septic shock and in models of ischemia-reperfusion in organs other than the liver.<sup>9,10,11,12,13,14,15,16,17,18</sup> The mechanism by which FBP can protect cells from damage are contradictory, but some authors believe that it can interact with cell membranes, modifying the ion permeability,<sup>19,20</sup> and enter in the cell, acting as a glycolytic intermediate producing adenosine triphosphate (ATP).<sup>21</sup> Moreover, recent studies with FBP demonstrated its immunomodulatory effect in T lymphocytes<sup>18</sup> and anti-inflammatory action.<sup>22</sup> Moresco *et al*<sup>23</sup> demonstrated that FBP may exert a protective effect for the preservation of rat livers during and after cold storage. Considering that in the preservation injury pathophysiology restoration of oxygenated blood flow is much more deleterious than ischemia<sup>24,25,26</sup>, one can state that it would be more important to study FBP role in this scenario. From our knowledge, after reperfusion in liver, FBP was not studied yet.

---

---

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Adult male Wistar rats weighing 300 to 450 g were used as donors and recipients. The rats were randomly assigned into two experimental groups. The preservation of the livers was performed with different solutions in each group: a) group 1 (n=5) UW solution (Viaspan, ® Bristol-Myers-Squibb); b) group 2 (n=5) FBP in saline solution containing 10 mmol/L. Donors and recipients were anesthetized with inhalation of isoflurane 1.5% (Isoflurano®Abbott) through face mask.

All the experiments were performed according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (revised 1985). The protocol was approved by the local Ethics Committee, and fulfilled all local regulations for research involving experimental animals.

**Liver isolation and storage.** Surgical procedures were performed under clean but not sterile conditions, and a surgical microscope ( MC.M903, D.F. Vasconcelos) was used during the entire procedure. After shaving and disinfecting the rat abdominal wall with Povidine Iodine, the donor abdomen was entered by a midline incision. Saline solution mixture containing 250U heparin (Liquemine®) was injected through the infrahepatic vena cava. The portal vein and the abdominal aorta was cannulated . Cold preservation solution (4° C) at a constant perfusion pressure of 60 cmH<sub>2</sub>O was infused through the portal vein and the aorta. The suprahepatic vena cava was transected close to the diaphragm, allowing outflow of the perfused. The subhepatic inferior cava vena, portal vein, and hepatic artery were divided. The liver was excised and placed in a plastic bag containing 80 ml of cold preservation solution on ice, and a cuff was placed on the suprahepatic vena cava before storage for 6 hours at 4°C. Samples from these cold storage solutions were taken at 2, 4 and 6 hours for biochemical measurements of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH), performed in a kinetic assay, Liquiform kit®. TBARS concentration was determined using a colorimetric reaction with thiobarbituric acid.

---

---

**Reperfusion.** After storage, explants were rinsed through the portal vein with 5 ml of saline solution at room temperature. The recipient abdomen was then entered by a midline incision. The native liver was maintained in situ. The infrahepatic vena cava and the abdominal aorta were dissected and clamped. Saline solution mixture containing 250U heparin was injected through the infrahepatic vena cava. The portal cuff was inserted into the aorta of the recipient below the renal artery level; and the suprahepatic vena cava cuff was placed on the recipient inferior vena cava. At this instant, the liver was reperfused by first releasing the aortic clamp and after the inferior vena cava clamp. After 15 minutes, the reperfusion system was interrupted and blood samples from the suprahepatic vena cava of the reperfused liver were taken for measurements of AST, ALT, LDH and TBARS. At this point, the anesthetized animal was sacrificed. So, the reperfused liver were rinsed through the portal vein with 5 ml of saline solution, and then hepatic fragments were processed for histological studies and measurements of TBARS, catalase (Chance method, 1979)<sup>25</sup> and nitric oxide derivatives (NO).

**Histological Analysis.** Liver biopsies were fixed in 10% buffered formalin. The tissue was subsequently embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin. Histological assessment of the liver was made by a single blinded skilful liver pathologist specialist.

**Data Analysis.** Statistics were performed with SPSS 10.0 for Windows. Results are expressed as mean  $\pm$  SD or median, when appropriate. Statistical analysis of enzymes, TBARS, catalase and NO was performed using Mann-Whitney test. Fisher exact test was used for qualitative variables. The level of statistically significant was defined as  $p < 0,05$ .

---

---

## RESULTS

Body weight was similar in both groups of rats donor (group 1,  $400 \pm 39$  g vs group 2,  $394 \pm 28$  g).

**Cold preservation.** After 2, 4 or 6 hours preservation, AST release in storage solution was significantly higher in the group 1 than AST release in the group 2 ( $p=.008$ ; Fig. 1). After 4 or 6 hours preservation, LDH measurements in storage solution in the group 2 was lower than the LDH measurements in group 1 ( $p=.03$  and  $p=.02$ , respectively; Fig.1). However, neither LDH level after 2 hours of storage nor ALT level after 2, 4 or 6 hours preservation had significant differences ( $p=.09$ ;  $p=.06$ ;  $p=.2$ ;  $p=.7$ , respectively; Fig.1).

**Reperfusion.** The serum level of AST, ALT and LDH post-reperfusion in the group 2 were significantly higher than these measurements in the group 1 ( $p=.02$ ; Fig.2). Similarly, catalase dosage in the group 2 was higher than that in the group 1 ( $p=.03$ ; Table 1). On the other hand, TBARS (liver tissue and post-reperfusion serum) and NO values were comparable between the two groups (Fig.2 and Table 1).

**Histology.** In 80 percent of group 1 livers and 60 percent of group 2 livers was demonstrated slight hepatocyte vacuolization ( $p=.4$ ). Steatosis was showed in 40% of group1 and in 60% of group 2 ( $p=.5$ ). Signs of injury preservation were detected in any of the organs. Moreover, sinusoidal congestion was observed in all livers preserved in FBP.

---

---

## DISCUSSION

UW solution is largely used in LT around the world. Though it provides a good preservation, it is not the ideal one. Liver primary non function after transplant continues to occur, and maybe it is related to the preservation injury<sup>27,28</sup>. Moreover, UW solution is expensive. So, searching for a new solution for preserving the graft is a reasonable supported task. The orthotopic rat liver transplant model is a widely used technique in transplantation research. It has many advantages over other animal transplant models because of its availability and low cost. However, it must be emphasized that success with the rat model requires thorough training. The present study compared FBP solution with UW solution. It was developed a new model of liver reperfusion in rats, providing cold storage, warm ischemia and reperfusion, in order to simulate a liver transplant procedure. First, this model was tested in a pilot study. When it was well reproducible, it was applied for the purposes of this study. During the pilot study, no more than 15 minutes of reperfusion was possible without hemodynamic derangement. Considering that ischemia reperfusion syndrome is defined as a decrease of mean arterial pressure of 30% occurring within 5 minutes of graft reperfusion and lasting at least 1 minute<sup>29</sup>, this period seemed adequate and was the standard time of reperfusion adopted.

At 2, 4 and 6 hours of preservation, AST and LDH release in storage solution was lower in the FBP group. These results suggest that FBP solution was better in protecting the liver during cold ischemia than UW solution was. The mechanisms responsible for the effects of FBP are still uncertain, and this study was not designed to check them. FBP can interact with the biomembrane to modify their ion permeability and to maintain cell viability<sup>27</sup>. In addition, it preserves intracellular ATP levels by activating the glycolytic pathway<sup>30,31</sup> and it has a chelating action on  $\text{Ca}^{2+}$  thereby modulating intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis<sup>32</sup>.

Furthermore, after reperfusion, the serum level of AST, ALT and LDH were higher in the FBP group than that in the UW group. These observations are in contrast with the findings of

---

---

the previous studies, in which the UW solution were more effective during cold preservation than after perfusion <sup>7,27</sup>.

Oxidative stress (OS) is a condition that reflects an imbalance between the availability of cellular oxidants and antioxidants. Numerous experimental studies have shown that reperfusion of the liver following ischemia produces OS due to the overgeneration of ROS, which is thought to be a major factor in mediating liver damage <sup>33</sup>. Presumably, the most important source of graft damage is the overproduction of ROS during the initial phase reperfusion, which is mainly mediated by activated Kupffer cells <sup>34</sup>. Their harmful effects are counterbalanced by efficient antioxidant mechanisms, including glutathione (GSH) and catalase actions, which are essential for cell integrity <sup>35</sup>. In the present study, OS was evaluated through TBARS values in the post-reperfusion serum and liver tissue, catalase activity and NO. The TBARS (liver tissue and serum) and NO measurements were comparable between the two groups, suggesting that FBP maybe has some protective effects after reperfusion. In this way, it is interesting that catalase activity in liver tissue was higher in the group 2 than group 1. It is possible that these results have correlation with the composition of preservation liquids. In contrast with FBP solution, UW solution has an antioxidant substance, the GSH <sup>2</sup>. Perhaps this particularity can explain the lowest catalase activity in the livers preserved with UW solution.

Regarding histological analysis, no signs of injury preservation were observed in any liver biopsy. It probably reflects a short reperfusion time. Therefore, all livers preserved in FBP solution had significant sinusoidal congestion. These results suggest a important injury to the sinusoidal endothelial cells (SEC) during the preservation. Cold ischemia specifically caused damage to the SEC. The SEC detached, lost cytoplasmic processes, became rounded as a result of alteration of the extracellular matrix and cytoskeleton, and sloughed into the sinusoidal lumen <sup>36</sup>.

In conclusion, FBP solution showed a protective effect in the preservation of rat livers during cold storage, but failed in preventing the post-reperfusion injury. As FBP was better

---

---

than UW during cold ischemia and comparable with this solution regarding OS measured by TBARS and NO derivatives, it seems that FBP maybe has a role to play in the way to become in the future an important component of a new storage solution.

---

---

**REFERENCE**

1. Wiesner RH. Current indication, contraindications and timing for liver transplantation. In: Busuttil RW, Klintmalm GB. Transplantation of the liver. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996.
  2. Belzer F, Southard J. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988; 45: 673.
  3. Gaffey MJ, Boyel JC, Traweek ST, Ali MA, Rezeig M, Caldwell SH, Iezzoni JC, et al. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1997; 25: 184-189.
  4. Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose -1,6-bisphosphate. *Free Radic Res Commun*. 1992; 16: 325-339.
  5. Shibuya H, Ohkohchin N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ase activity in the perfused rat liver after cold preservation. *Transplant Proc*. 1997; 29: 1328-1330.
  6. Upadhyga GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/ tryptophan/ ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*. 2000; 31: 1115-1122.
  7. Kahn D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomotic biliary strictures (correction of structures)? *HPB Surg*. 1996; 9: 113-115.
  8. Kirtley ME, McKay M. Fructose -1,6- bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol Cell Biochem*. 1977; 18: 141-149.
  9. Markov AK, Oglethorpe NC, Blake TM, Lehan PH, Hellems HK. Hemodynamic, eletrocardiographic and metabolic effects of fructose diphosphate on acute myocardical ischemia. *Am Heart J*. 1980; 100: 639-646.
  10. Markov AK, Oglethorpe N, Young DB, Hellems HK. Irreversible hemorrhagic shock-treatment and cardiac pathophysiology. *Circ Shock*. 1981; 8: 9-19.
-



- 
11. Markov AK, Turner MD, Oglethorpe N, Hellems HK. Fructose 1-6 diphosphate: an agent for treatment of experimental endotoxin shock. *Surgery*. 1981; 90: 482-488.
  12. Heckler FR, Markov AK, Jones W. Effects of fructose 1-6 diphosphate on canine hind limbs subjected to tourniquet ischemia. *J Hand Surg*. 1983; 8: 622-623.
  13. Didlake RH, Kirchner KA, Lewis J, Bower JD, Markov AK. Protection from ischemic renal injury by fructose -1,6- diphosphate infusion in the rat. *Circ Shock*. 1985; 16: 205-212.
  14. Markov AK. Hemodynamic and metabolic effects of fructose 1-6 diphosphate (FDP) in ischemia and shock- experimental and clinical observations. *Ann Emerg Med*. 1986; 15: 1470-1477.
  15. Markov AK, Terry JW, White TZ, Didlake RH, Hellems HK. Increasing survival of dogs subjected to hemorrhagic shock with fructose 1-6 diphosphate. *Surgery*. 1987; 102: 515-527.
  16. Sun J, Farias LA, Markov AK. Prevention of intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats with fructose 1-6 diphosphate (FDP). *Gastroenterology*. 1990; 98: 117-126.
  17. Markov AK, Rayburn TS, Talton DS, Netherland DE, Moore C, Heater B, Cohey HH. Fructose -1,6- diphosphate alone and in combination with cyclosporine potentiates rat cardiac allograft survival and inhibits lymphocyte proliferation and interleukin-2 expression. *Transplantation*. 2002; 74: 1651-1654.
  18. Nunes FB, Pires MG, Alves Filho JC, Wachter PH, De Oliveira JR. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose -1,6- bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med*. 2002; 30: 2069-2074.
  19. Cattani L, Costrini R, Cerilli C. Fructose -1,6- diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. *Agressologie*. 1980; 21: 263-264.
  20. Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, Chance B. Mechanism of the effect of exogenous fructose -1,6- bisphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation*. 1991; 83: 584-593.
-

- 
21. Lazzarino G, Nuutinen ME, Tavazzi B, Cerroni L, Dipierro D, Giardina B. Preserving effect of fructose -1,6- bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated Langendorff-perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1991; 23:13-23.
  22. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, Lunardellia A, Pires MG, Wachter PH, De Oliveira JR. An assessment of fructose –1,6- bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res.* 2003; 47: 35-41.
  23. Moresco RN, Santos RCV, Alves Filho JCF, Cunha AA, Reis C, Reichel CL, Oliveira JR. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplant Proc.* 2004; 36: 1261-1264.
  24. Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuta H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg.* 1992; 79: 310-313.
  25. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock.* 1997; 8: 86-94.
  26. Baron PW, Sindram D, Higdon D, Howell DN, Goltfried MR, Tuttle-Newhall JE, Clavien PA. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2000; 6: 407-412.
  27. Brass JA, Crawford JM, Narciso JP, Gollan JL. Evaluation of University of Wisconsin cold-storage solution in warm hypoxic perfusion of rat liver: the addition of fructose reduces injury. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1455-1463.
  28. Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, Kuba D, Mislánová C, Kebis A, Danninger F, Mráz P. Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbeck's Arch Surg.* 2001; 386: 31-37.
  29. Ayoub T; Ahmed K. Liver transplant anesthesia: an update. *Curr Opin Organ Transplant.* 2003; 8: 252-257.
-

- 
30. De Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, Bartrons R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology*. 1992; 15: 1147-1153.
  31. Sano W, Watanabe F, Tamai H, Furuya E, Mino M. Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology*. 1995; 108: 1785-1792.
  32. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation*. 2002; 74: 779-783.
  33. Busquets J, Serrano T, Figueras J, Ramos E, Torras J, Rafecas A, Fabregat J, Xiol X, *et al*. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc*. 2002; 34: 252-253.
  34. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo. *Am J Physiol*. 1991; 260: G355-G362.
  35. Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology*. 1999; 117: 200-210.
  36. Holloway C, Harwey P, Strasberg S. Viability of sinusoidal lining cells in cold-preserved rat liver allografts. *Transplantation*. 1990; 49: 225-229.
-

## FIGURE LEGENDS

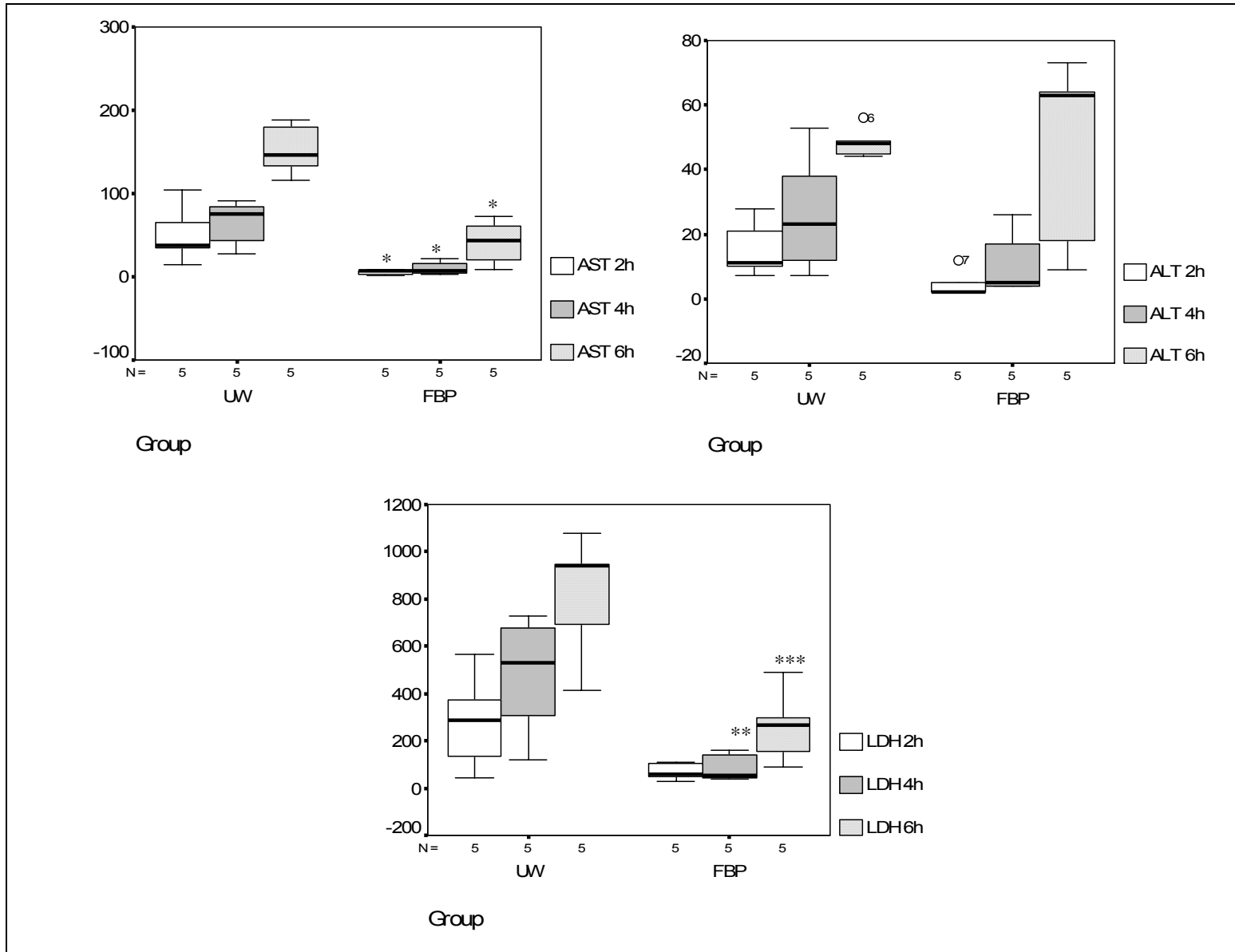


Fig. 1. AST, ALT and LDH release in preservation solution obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW or FBP cold storage solutions. Significant differences between group 1 and group 2 were indicated by \* $p=0.008$ , \*\* $p=0.03$ , \*\*\* $p=0.02$ . (median  $\pm$  interquartile range; Mann-Whitney test).

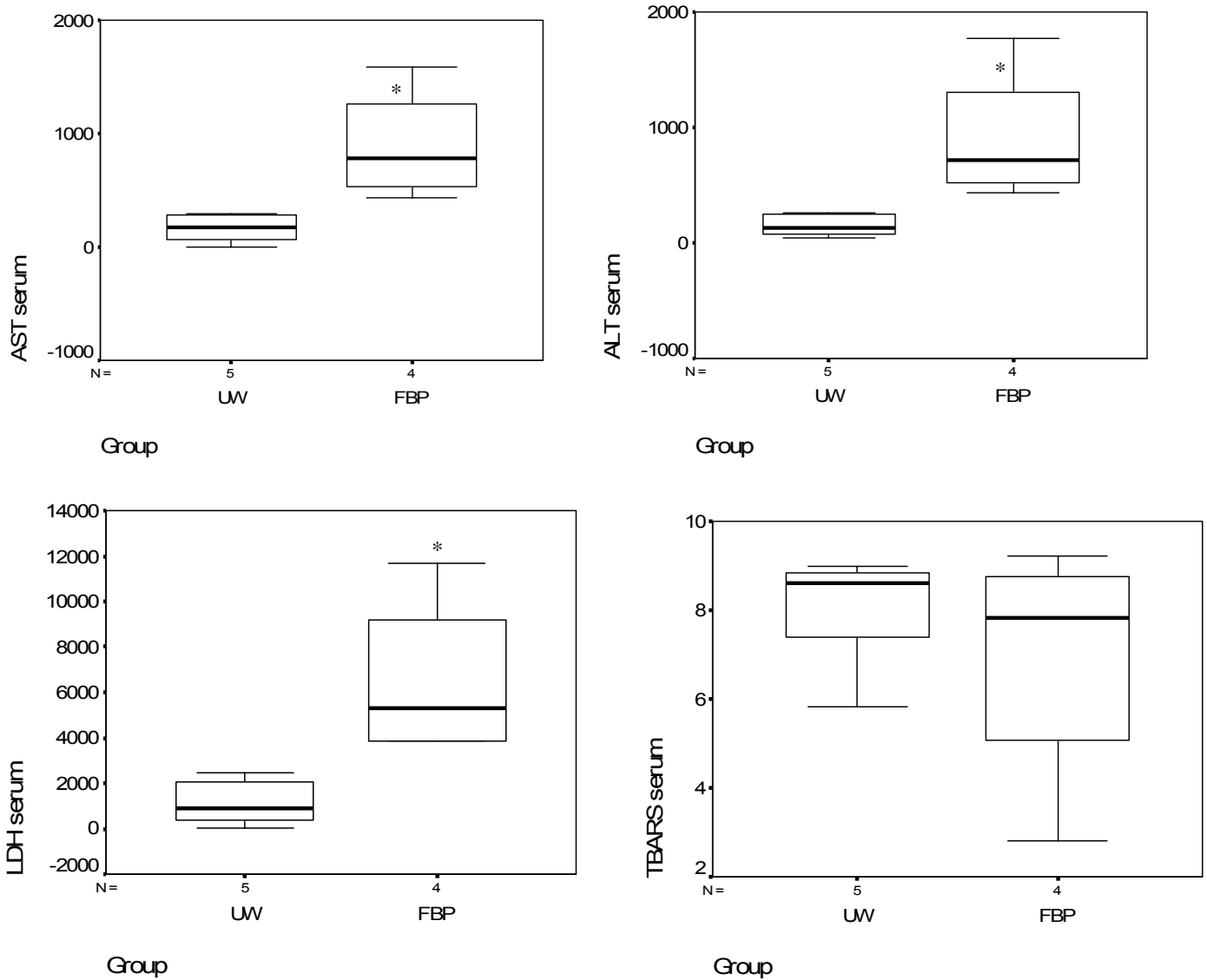


Fig. 2. AST, ALT, LDH and TBARS level in the serum post-reperfusion obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW or FBP cold storage solutions. Significant differences between group 1 and group 2 were indicated by \* $p=0.02$ . (median  $\pm$  interquartile range; Mann-Whitney test). See text for abbreviations.

**Table 1:** TBARS, catalase and NO derivates dosages in post-reperfusion liver tissue.

	<i>Grupo 1 (UW)</i> <i>(n=5)</i>	<i>Grupo 2 (FBP)</i> <i>(n=5)</i>	
<b>TBARS</b> (nmol/g)	9,8 (7,4-12,7)	11,1 (7,1-14,4)	<i>p= 0,6</i>
<b>Catalase</b> (U/mg/prot)	327 (255-327)	435 (350-497,5)	<i>p= 0,03*</i>
<b>NO derivates</b> (nmol/mg/prot)	0,06 (0,04-0,12)	0,07 (0,05-0,09)	<i>p= 1,0</i>

Values expressed as median  $\pm$  interquartile range. Mann-Whitney test. The significant difference was admitted with  $p < 0,05$  (\*). See text for abbreviations.