

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

**S-NITROSO-N-ACETILCISTEÍNA (SNAC) NA
PRESERVAÇÃO DE FÍGADOS DE RATOS: ANÁLISE DO
SEU EFEITO NO DANO PRECOCE DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

Tese de Doutorado

Raquel Scherer de Fraga

Porto Alegre

20 de Novembro de 2009

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

**S-NITROSO-N-ACETILCISTEÍNA (SNAC) NA
PRESERVAÇÃO DE FÍGADOS DE RATOS: ANÁLISE DO
SEU EFEITO NO DANO PRECOCE DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO**

Raquel Scherer de Fraga

Tese de Doutorado

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

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

Fraga, Raquel Scherer de

S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) na preservação de fígados de ratos: análise do seu efeito no dano precoce de isquemia/reperfusão / Raquel Scherer de Fraga. –Porto Alegre: UFRGS, PPG: Ciências em Gastroenterologia, 2009

vi, 55f. : il.; 29 cm.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva

Tese (doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, 2009

Referências Bibliográficas: f. 43-54

1. Transplante hepático. 2. Isquemia e reperfusão. 3. Gastroenterologia-Tese. I. Álvares-da-Silva, Mário Reis. II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia. III. Título.

Não basta a agudeza intelectual para descobrir uma coisa nova. Faz falta entusiasmo, amor prévio por essa coisa. O entendimento é uma lanterna que necessita de ir dirigida por uma mão, e a mão necessita de ir mobilizada por um anseio pré-existente para este ou outro tipo de possíveis coisas. Em definitivo, somente se encontra o que se busca e o entendimento encontra porque o amor busca. Por isso todas as ciências começaram por ser entusiasmos de amadores (...). Pensaram vocês na surpreendente contextura do buscar? O que busca não tem, não conhece ainda aquilo que busca e, por outra parte, buscar é já ter de antemão e conjecturar o que se busca. Buscar é antecipar uma realidade ainda inexistente, preparar o seu aparecimento, a sua apresentação.

Ortega y Gasset, in 'O Que é a Filosofia?'

Dedicatória

*Para **Luís**, meu esposo e grande amor, pelo incentivo, carinho, e compreensão .*

*Para meu filho, **Mateus**, pela aceitação da falta de minha companhia durante as noites e fins de semana que dediquei a elaboração deste material.*

*Para minha mãe, **Venita**, que sempre me ensinou o caminho do estudo e da dedicação para vencer na vida.*

Agradecimentos especiais

*Ao **Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva**, meu orientador, amigo, e padrinho de casamento, pelo constante incentivo e pela confiança, mais uma vez depositada em mim, já que foi também meu orientador de mestrado. Durante todos estes anos que convivemos, ele se tornou a minha fonte de inspiração. “Orientador” é a palavra certa para defini-lo: é sob sua luz que guio meus passos. Muito obrigada!*

*À **Dra Vera Regina R. Camacho**, minha colega e amiga, que dividiu comigo todas as etapas da realização desta tese, compartilhando as conquistas e insucessos dela decorrentes. Agradeço também pela companhia e ensinamentos de vida durante as intermináveis horas que passamos juntas na Unidade de Experimentação Animal do HCPA.*

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.

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

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando de Magalhães Francesconi pela amizade e pelos ensinamentos fundamentais durante a minha formação.

À Prof. Dra Themis Reverbel da Silveira pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

Ao Dr. Rosemar Stefenon, meu colega, pela amizade e por ter cuidado dos pacientes na minha ausência ao me dedicar a esta tese.

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

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

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

Ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski e Prof. Dra Luise Meurer, pela análise histológica, demonstrando-se sempre disponíveis.

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

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

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

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

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

À **Sra Vania Naomi Hirakatu**, pelo auxílio na análise estatística.

Ao acadêmico de Medicina, **Erik da Costa Irion**, 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**, e ao **Sr. Fernando Augusto Soares**, secretário do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela competência, dedicação e carinho dispensados.

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS **I**

LISTA DE TABELAS **III**

LISTA DE FIGURAS **IV**

RESUMO **V**

ABSTRACT **VI**

INTRODUÇÃO **1**

1. Dano de isquemia-reperfusão **1**
2. O estresse oxidativo **4**
3. O óxido nítrico **5**
 - 3.1 O óxido nítrico e o dano de isquemia/reperfusão hepática **7**
4. Métodos de estimativa do dano de isquemia-reperfusão **8**
 - 4.1. Dosagem de enzimas hepáticas **8**
 - 4.2. Avaliação do estresse oxidativo **9**
 - 4.3. Citocinas e moléculas de adesão **9**
5. Soluções de preservação **9**
6. S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) **11**

JUSTIFICATIVA **13**

OBJETIVOS **14**

MATERIAIS E MÉTODOS **15**

1. Desenho do estudo e animais de experimentação **15**
2. Procedimentos **15**
3. Dosagem de TBARS, catalase e glutathiona no tecido hepático **17**
4. Análise histológica **17**
5. Imuno-histoquímica **17**
6. Microscopia eletrônica **18**
7. Tamanho da amostra **18**

8. Análise estatística **18**

ASPECTOS ÉTICOS **19**

FINANCIAMENTO **20**

RESULTADOS **21**

1. Preservação a frio **22**

2. Reperusão **24**

3. Histologia **24**

4. Imuno-histoquímica **26**

5. Microscopia eletrônica **26**

DISCUSSÃO **30**

1. Em relação à linha de pesquisa em isquemia/reperusão hepática **30**

2. Em relação ao desenho do estudo **33**

3. Em relação aos resultados durante isquemia a frio **35**

4. Em relação aos resultados após a reperusão **37**

5. Limitações do estudo **40**

6. Possíveis aplicações futuras **41**

CONCLUSÕES **42**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **43**

ANEXOS **55**

1. Artigo publicado do modelo de reperusão utilizado

2. Dados brutos

3. Artigo para publicação

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT= alanina aminotransferase

ANOVA= análise de variância

AST= aspartato aminotransferase

ATP= trifosfato de adenosina

CES= células endoteliais sinusoidais

CK= células de Kupffer

CMU-1= solução da Universidade da China

CREAL= Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CySNO= S-nitroso-L-cisteína

eNOS= sintases do óxido nítrico endotelial

EO= estresse oxidativo

FBP= frutose -1,6- bisfosfato

GM-CSF= fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

GSNO= S-nitrosoglutationa

HCPA= Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE= hematoxilina-eosina

HTK= histidina-triptofano-cetoglutarato

ICAM= moléculas de adesão intercelular

IL= interleucina

INF= Interferon

iNOS= sintases do óxido nítrico induzível

I/R= dano de isquemia/reperfusão

LDH= lactato desidrogenase

LTB4= leucotrieno B4

nNOS= sintases do óxido nítrico neural

NO= óxido nítrico

NOS= sintases do óxido nítrico

PAF= fator ativador de plaquetas

PMN= polimorfonucleares

RNOS= espécies reativas de nitrogênio

ROS= espécies reativas do oxigênio

RSNO= S-nitrosotióis

SLPI= inibidor da secreção das proteases leucocitárias

SNAC= S-nitroso-N-acetilcisteína

TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF= fator de necrose tumoral

TNF-R2= receptor 2 do fator de necrose tumoral

TxH= transplante hepático

UEA= Unidade de Experimentação Animal

UW= solução de preservação da Universidade de Wisconsin

VCAM= moléculas de adesão de célula vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isoformas da NOS no fígado . **6**

Tabela 2. Os componentes da UW e seu papel na proteção contra o I/R. **11**

Tabela 3. Características do procedimento: peso do doador, tempo de retirada do órgão, tempo de isquemia a quente. **21**

Tabela 4. Dosagem de AST, ALT e LDH no líquido de preservação nos grupos UW, SNAC e SNAC+UW. **22**

Tabela 5. Medidas de AST, ALT, LDH, TBARS, catalase e glutathiona após a reperfusão nos 3 grupos experimentais. **24**

Tabela 6. Estudos experimentais com diferentes soluções de preservação em comparação com UW. **32**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos envolvidos na fisiopatogênese do I/R. **3**

Figura 2. Representação esquemática da mitocôndria num cenário de EO. **5**

Figura 3. Esquema simplificado do modelo de reperfusão. **16**

Figura 4. Níveis de AST, ALT e LDH no líquido de preservação (UW, SNAC e SNAC+UW). **23**

Figura 5. Balonização hepatocitária focal. **25**

Figura 6. Congestão hepática leve focal. **25**

Figura 7. Imuno-histoquímica da expressão de ICAM-1 no estudo e no controle positivo. **27**

Figura 8. Imuno-histoquímica da expressão de TNF-R2 no estudo e no controle positivo. **28**

Figura 9. Foto representativa da ultraestrutura mitocondrial das amostras hepáticas estudadas. **29**

RESUMO

Introdução e objetivos: O dano de isquemia-reperfusão (I/R) é uma das principais causas de má-função do enxerto precocemente após um transplante hepático e influencia de forma adversa a sobrevida dos pacientes após o transplante. Uma série de mediadores tem sido implicada na sua patogênese, incluindo o óxido nítrico (NO). Devido aos benefícios do NO durante a pré-condição isquêmica e perfusão, estratégias para prevenir ou melhorar o I/R através do estímulo da produção hepática de NO é uma área de significativo interesse clínico. Neste estudo, foi avaliado o papel da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) como uma doadora de NO na prevenção do I/R em um modelo animal.

Materiais e métodos: Fígados obtidos de 15 ratos *Wistar* machos foram divididos em 3 grupos experimentais, conforme a solução de preservação utilizada: solução da Universidade de Wisconsin (UW); solução de SNAC; e solução de UW + SNAC (SNAC+UW). Os níveis de AST, ALT e LDH foram determinados em amostras do líquido de preservação em 2, 4 e 6 horas de isquemia a frio. Após 6 h, os fígados foram submetidos a um modelo de perfusão hepática *ex-situ* por 15 minutos. AST, ALT, LDH e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas no sangue após a perfusão, e foram seccionados fragmentos hepáticos para histologia, determinação de TBARS, catalase e glutatona, além da análise da expressão imunohistoquímica de ICAM-1 e TNF-R2.

Resultados: Durante a preservação a frio, a liberação de AST e LDH no grupo SNAC foi significativamente menor que nos grupos UW e SNAC+UW ($p=0.004$ and $p=0.03$, respectivamente), não tendo havido diferença significativa na dosagem de ALT ($p=0.3$). Após a perfusão, os níveis séricos de AST, ALT e LDH, bem como de TBARS e catalase foram semelhantes entre grupos. Comparado ao grupo UW, a concentração hepática de glutatona foi menor nos grupos SNAC e SNAC + UW ($p<0.001$). Não houve sinais histológicos de dano de preservação em nenhuma amostra, assim como não houve expressão hepática de ICAM-1 e TNF-R2.

Conclusão: A solução de SNAC demonstrou um efeito protetor superior na preservação de fígados de ratos durante a isquemia a frio, tendo sido equivalente à UW após a perfusão.

ABSTRACT

Background/aims: Ischemia-reperfusion injury (I/R) is one of the major causes of poor graft function early after liver transplantation which adversely influences patients' survival. A variety of mediators have been implicated in the pathogenesis of ischemia-reperfusion vascular injury, including nitric oxide (NO). Due to the beneficial effects of NO during preconditioning and reperfusion, strategies to prevent or ameliorate I/R through the stimulation of hepatic NO production are an area of significant clinical interest. We evaluated the role of S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) as an NO donor, in the prevention of liver I/R in an animal model.

Methods: Adult male Wistar rats were randomly assigned into three experimental groups of 5 animals, accordingly to the preservation solution: 1. University of Wisconsin (UW) solution; 2. SNAC solution; and 3. SNAC-containing UW solution (SNAC+UW). AST, ALT and LDH were determined on samples of the cold storage solution at 2, 4 and 6 h of preservation. After 6 h of cold storage, a 15 min reperfusion model was applied. After this period, the reperfusion system was interrupted and blood samples were taken for measurements of AST, ALT, LDH and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Hepatic fragments were processed for histological studies, determination of TBARS, catalase and glutathione, and also expression ICAM-1 and TNF-R2.

Results: During the cold preservation, AST and LDH in the SNAC group were significantly lower than in UW group and the SNAC+UW group ($p=0.004$ and $p=0.03$, respectively). ALT was comparable among the groups ($p=0.3$). After reperfusion, serum levels of AST, ALT and LDH, as well as hepatic TBARS and catalase showed no significant differences among the groups. Compared to the UW group glutathione concentration was lower in the SNAC and SNAC+UW ($p<0.001$). No histological signs of preservation injury were found. In immunohistochemistry, the expression of ICAM-1 and TNF-R2 were not detected in any of the organs.

Conclusion: SNAC solution showed a higher protective effect for the preservation of rat livers during cold storage, but was comparable to UW solution post-reperfusion.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o transplante hepático (TxH) é o tratamento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves do fígado ⁽¹⁻⁶⁾. Seus bons resultados permitiram que fosse ofertado mais precocemente no curso da doença hepática avançada. No entanto, é notável que nos últimos anos, a despeito do crescente número de TxH realizados, houve em todo o mundo um acréscimo na mortalidade em lista ^(7,8). Este fato é consequência da maior demanda por transplante, sem que haja órgãos disponíveis para todos ^(2,4,9-15). Com a pouca oferta, é natural que sejam aceitos órgãos providos dos chamados “doadores subótimos ou com critérios expandidos”, indivíduos com condições hemodinâmicas limítrofes, idade avançada ou presença de infiltração gordurosa significativa, entre outros. Sabe-se que quanto pior o doador, pior o enxerto, elevando-se as chances do mesmo ser danificado durante os procedimentos de retirada e implante ⁽¹⁶⁾. No entanto, face à demanda crescente e à oferta limitada, o uso de fígados provenientes destes doadores parece justificado ^(1, 4,17-18). 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 ^(11-12, 14, 16,19).

Assim, parece lógico que seja necessário o aprimoramento na técnica de preservação com o intuito de reduzir ao máximo o dano de isquemia/reperfusão (I/R) ⁽²⁰⁾. Se nos aspectos cirúrgicos, anestésicos e de uso de imunossupressores há pouco espaço para a evolução, parece que se encontra na preservação de órgãos a oportunidade de serem incrementados os resultados do TxH.

1. Dano de isquemia-reperfusão

A realização de um TxH envolve obrigatoriamente o surgimento de isquemia tecidual ⁽²¹⁻²³⁾, denominando-se de I/R os fenômenos nocivos decorrentes desse processo. Sabe-se que a intensidade do I/R é dependente de diversas fases: das condições pré-mórbidas do doador, da adequação da preservação do enxerto, da isquemia a quente do órgão, da sua revascularização e ainda do ambiente pessoal do receptor ^(21, 24-25).

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 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{atpase}$ e alteração na troca de água e íons. Isto promove a ativação de enzimas hidrolíticas, ocasionando edema das células endoteliais sinusoidais (CES) e das células de Kupffer (CK) durante o período de isquemia ^(24, 26-31).

A lesão do enxerto teoricamente cessaria no momento em que o órgão fosse reperfundido pelo sangue portal, mas este cenário é apenas teórico. A reperusão com o sangue portal, ao invés de interromper esta cascata de dano, a ela acrescenta maior risco, por vezes mais notável que as fases prévias ⁽³²⁻³⁴⁾. As lesões ocorridas durante a isquemia, associado ao desequilíbrio entre a produção de endotelina e óxido nítrico (NO) após a reperusão, contribui para o estreitamento da luz sinusoidal, culminando com disfunção microcirculatória. Somando-se a isto, o estreitamento dos capilares favorece o acúmulo de polimorfonucleares (PMN) ⁽³⁵⁻³⁶⁾, que, junto com as CK ativadas, induzem a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) ⁽³⁷⁻³⁸⁾. Tais citocinas disparam a expressão das moléculas de adesão – moléculas de adesão intercelular (ICAM) e moléculas de adesão de célula vascular (VCAM)- e promovem a ativação e acúmulo de mais PMN, contribuindo para a progressão do dano ao parênquima ^(37,39). Em paralelo, a IL-1 e o TNF recrutam e ativam linfócitos T- CD4, que produzem fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferon γ (INF γ), e TNF β , de forma a magnificar a ativação das CK e a secreção de citocinas ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Tal processo pode ser amplificado pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pelo leucotrieno B4 (LTB4) ⁽⁴³⁾ (Figura 1).

O resultado final desta resposta inflamatória aguda é determinado pelo equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios. Embora tenha se avançado na compreensão dos mecanismos envolvidos no início e na perpetuação da resposta inflamatória hepática induzida pelo processo de isquemia e reperusão, ainda pouco se conhece sobre os eventos reguladores, que servem para controlar e resolver este dano inflamatório. Os mediadores regulatórios mais

importantes parecem ser a IL6, a IL10 e os inibidores da secreção das proteases leucocitárias (SLPI), todos induzidos precocemente (nas primeiras 2 horas) após a reperfusão ⁽³⁷⁾.

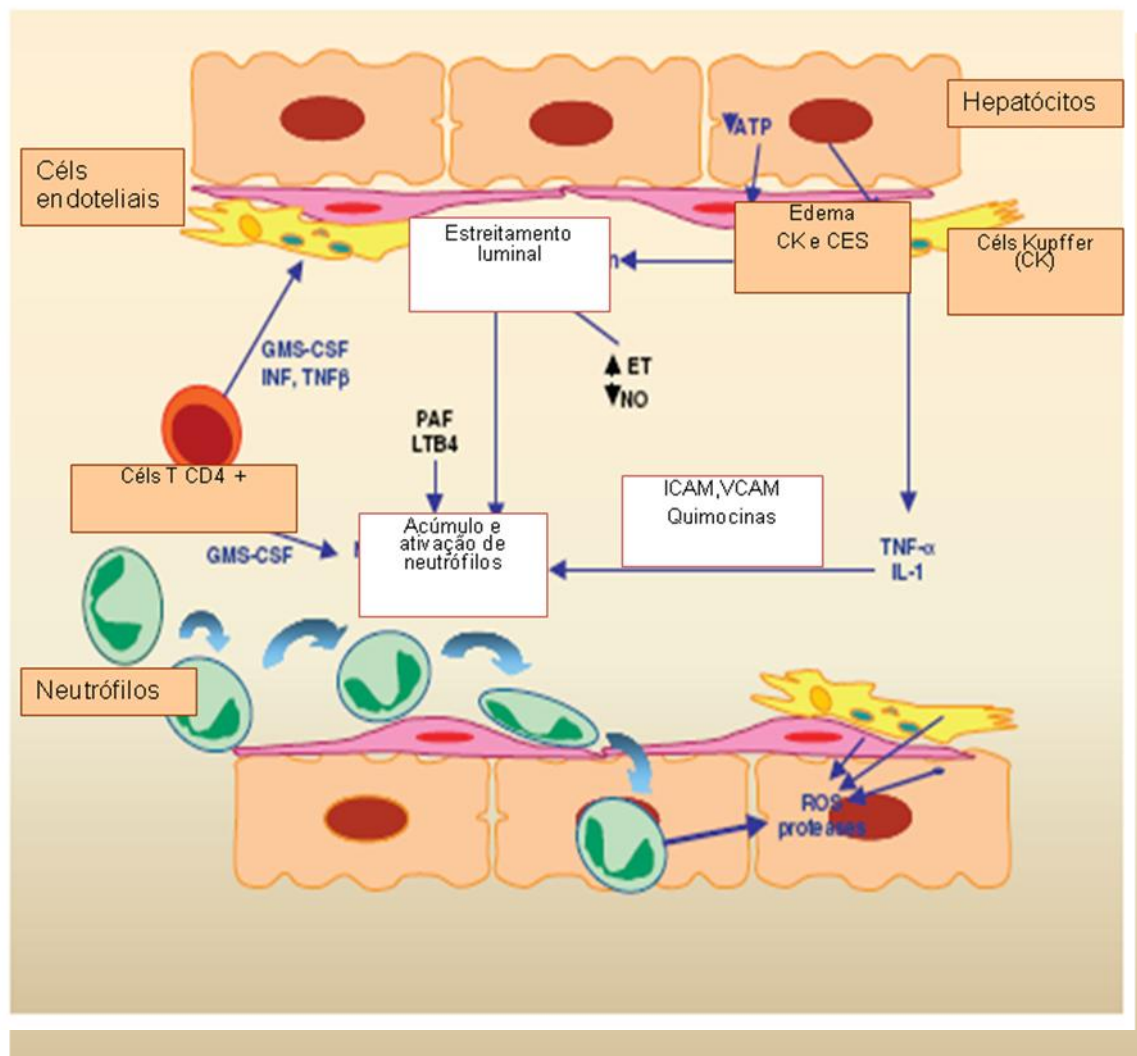


Figura 1: Mecanismos envolvidos na fisiopatogênese do I/R. (Adaptado de Massip-Salsedo et al, 2007) ⁽⁴³⁾.

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

São os hepatócitos e as CES os maiores alvos do I/R, sendo que os hepatócitos são mais sensíveis à isquemia a quente e as CES, à isquemia a frio ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Apesar da maioria dos hepatócitos permanecerem viáveis após 48 h de preservação a frio seguido de reperfusão, as CES sofrem grave dano após a

reperfusão (40% não viáveis) ⁽⁴⁶⁾. O resultado desta lesão sinusoidal é a subsequente anormalidade microcirculatória, que culmina em disfunção e destruição hepatocitária ^(44, 47), contribuindo para a não função primária do enxerto após o TxH.

2. O estresse oxidativo

O fenômeno da toxicidade do oxigênio é conhecido desde o final do século XIX. No entanto, a presença de ROS em materiais biológicos foi identificada há apenas 50 anos ⁽⁴⁸⁾.

As ROS podem ser definidas como espécies químicas capazes de existirem independentemente e que apresentem um ou mais elétrons desemparelhados. As ROS são altamente reativas, apresentando grande instabilidade e meia-vida curta. Este é o motivo pelo qual as ROS não se deslocam para longe de seu sítio de formação, interagindo com qualquer biomolécula adjacente a fim de se estabilizarem ⁽⁴⁹⁾.

Os mecanismos pelos quais as células são atacadas pelas ROS são muito complexos e ainda não perfeitamente claros. A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de ROS que é contrabalançada pelo consumo de defesas 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 ^(48,50).

McCord em 1985 lançou a teoria de que as ROS seriam as promotoras do dano de reperfusão ⁽⁵¹⁾. A isquemia ativa as CK, que, por sua vez, são a principal fonte de ROS durante o período de reperfusão ^(52,53), sendo as mitocôndrias as principais geradoras intracelulares de ROS ⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾.

A geração mitocondrial de ROS 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 consequente desequilíbrio na

fisiologia das células e suas organelas. Dentro deste contexto, as estruturas mitocondriais também consistem na principal organela suscetível ao ataque pelas ROS, com dano estrutural e funcional, e eventual disfunção de importantes processos celulares, incluindo aqueles responsáveis pela síntese de trifosfato de adenosina (ATP) ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ (Figura 2).

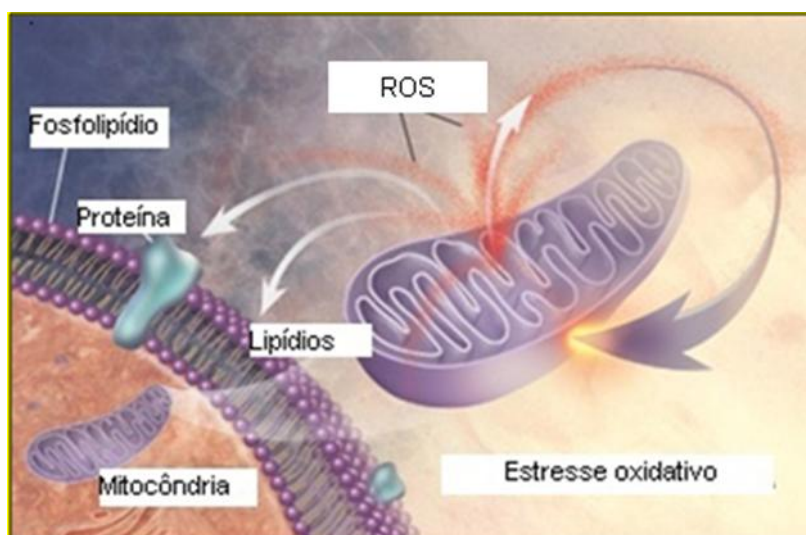


Figura 2: Representação esquemática da mitocôndria num cenário de EO. É considerada a principal organela envolvida na produção das ROS.

EO= estresse oxidativo; ROS= espécies reativas de oxigênio

3. O óxido nítrico

O NO tem atraído o interesse de muitos cientistas desde a sua identificação ⁽⁵⁹⁾, e atualmente dispõe-se de um amplo conhecimento sobre sua bioquímica e fisiologia. Ele é uma molécula gasosa produzida pela família de enzimas P-450- *like* denominadas de sintases do NO (NOS), que convertem L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO. Existem três isoformas de NOS já isoladas e caracterizadas: NOS endotelial (eNOS), NOS induzível (iNOS), e NOS neuronal (nNOS). Todas elas estão expressas no fígado em proporções variadas (Tabela 1) ⁽⁶⁰⁾. Tanto a nNOS quanto a eNOS mantêm especificidade celular, sendo a primeira detectada apenas nos tecidos nervosos e a última, exclusivamente nas células endoteliais que revestem os canais vasculares hepáticos ⁽⁶¹⁻⁶³⁾. Em contrapartida, iNOS não está presente no fígado em

condições basais, mas pode ser expressa em todos os tipos celulares hepáticos mediante estímulo ⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾.

Tabela 1. Isoformas da NOS no fígado

Isoforma da NOS	Distribuição no fígado
eNOS	Células endoteliais
iNOS	Qualquer célula hepática, se induzida
nNOS	Nervos do trato portal

Adaptado de Shah & Kamath, 2003 ⁽⁶⁰⁾

NOS= sintases do óxido nítrico; eNOS= sintase do óxido nítrico endotelial; iNOS= sintase do óxido nítrico induzida; nNOS= sintase do óxido nítrico neural

O NO consiste em uma molécula radical neutra que, por ser cerca de 70 vezes mais solúvel em solventes hidrofóbicos que em água ⁽⁶⁸⁾, é facilmente difusível nos compartimentos celulares. Nos sistemas biológicos, ele pode reagir com várias outras substâncias, como moléculas de oxigênio e ânion superóxido (O_2^-), produzindo as chamadas espécies reativas de nitrogênio (RNOS). A meia-vida do NO *in vivo* é de poucos milissegundos, sugerindo que esta molécula pode exercer seu papel a apenas uma distância de poucos microns do seu sítio de geração. Entretanto, sua conversão em RNOS pode preservar o NO, permitindo que seu efeito possa ser transferido a alvos distantes ⁽⁶⁹⁾. Exemplos disto são representados pelos experimentos de Rassaf *et al*, que demonstrou que a maioria dos efeitos sistêmicos do NO administrado via intravenosa são mediados pela sua conversão em S-nitrosotióis (RSNO) ⁽⁷⁰⁾. Dessa forma, os efeitos biológicos do NO podem ser caracterizados como diretos (resultante da reação do NO com as moléculas alvo) ⁽⁷¹⁾ e indiretos (devido à ação das RNOS e dos RSNOs) ⁽⁷²⁾.

O NO pode ser administrado através de drogas doadoras de NO, o que inclui os RSNO ⁽⁶⁹⁾. Alguns destes compostos ocorrem naturalmente *in vivo*, como a S-nitrosoalbumina, a S-nitroso-L-cisteína (CysNO), e a S-nitrosoglutationa (GSNO), e outros são sintetizados, como a S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) ⁽⁷³⁻⁷⁵⁾.

3.1. O óxido nítrico e o dano de isquemia/reperfusão hepática

O I/R vem sendo estudado numa variedade de modelos animais desenvolvidos especificamente para investigar cada etapa do processo de transplante. Baseado nestes estudos, alguns dos principais processos fisiopatológicos no desenvolvimento do I/R se relaciona à piora da microcirculação hepática, incluindo adesão leucocitária, EO, e congestão sinusoidal, uma vez que o desarranjo da microcirculação hepática exerce um papel fundamental na falência celular ⁽⁷⁶⁾.

Uma variedade de mediadores tem sido implicada na patogênese do I/R vascular, incluindo o NO, que modula o fluxo e a adesão celular dentro da vasculatura. Manipulação da bioatividade do NO através da inibição ou do aumento de sua concentração em modelos experimentais de I/R suporta o papel do NO neste cenário ⁽⁷⁷⁻⁸³⁾. A administração de inibidores da NOS exacerba o dano em modelos experimentais de I/R, como evidenciado por diminuição da perfusão microcirculatória e elevação de enzimas hepáticas ^(78,80,82-83). Estes estudos suportam o conceito de que deficiência hepática de NO é uma das causas precoces do I/R, contribuindo para a estase e constrição sinusoidal, ocasionando falência da perfusão ⁽⁸⁴⁾. Entretanto, os mecanismos específicos de deficiência de NO permanecem desconhecidos e áreas de pesquisa incluem o estudo de uma provável redução na viabilidade de algum cofator ou um excesso de inibidores da rota da NOS, como a arginase ou argininas dimetil assimétricas ⁽⁸⁵⁾.

O NO também parece contribuir com efeitos protetores na pré-condição isquêmica, um paradoxo pelos quais breves períodos de oclusão vascular protegem o fígado de danos subsequentes de isquemia/reperfusão ^(82,86-88). Os efeitos protetores da pré-condição isquêmica são mediados em parte pela

liberação celular de adenosina (um nucleotídeo que promove vasodilatação e inibição da adesão leucocitária, por estimular a produção de NO) e pela redução da sinalização das células hepáticas endoteliais ⁽⁸⁶⁾. Este conceito é embasado em observações que tanto os inibidores da NOS quanto a adenosina deaminase (um agente que reduz os níveis de adenosina endógena) podem atenuar a resposta benéfica da pré-condição isquêmica em modelos animais ⁽⁸⁷⁾. Por outro lado, os inibidores da NOS com especificidade para a isoforma iNOS demonstram efeito oposto. Desta forma, alguns estudos sugerem que o NO derivado da eNOS é protetor no I/R, enquanto que o NO derivado da iNOS pode exacerbar o dano isquêmico ⁽⁸⁹⁻⁹⁰⁾. Este aparente paradoxo pode ser reflexo da cinética de geração do NO no processo de isquemia-reperfusão: em condições basais, há baixo nível de geração de NO pela eNOS, o que protege as células do dano isquêmico; em contraste, após várias horas do estímulo isquêmico, inicia a produção de NO pela iNOS, tornando o NO um agente destrutivo ⁽⁹¹⁾. Estes eventos podem culminar em lipoperoxidação lipídica, morte celular e dano hepático.

4. Métodos de estimativa do dano de isquemia/reperfusão

O I/R pode ser estimado através de diversos parâmetros, que refletem diferentes momentos deste processo.

4.1 Dosagem de enzimas hepáticas

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 ⁽⁹²⁾, sendo um marcador dos danos pré-existentes ou adquiridos durante o período de isquemia ⁽⁹³⁾.

Além disso, as lesões decorrentes do dano de preservação podem ser aferidas pela magnitude da elevação das enzimas hepáticas no soro do receptor, especialmente a AST. Rosen *et al* estudando 210 indivíduos

submetidos a TxH, demonstraram que os pacientes com AST acima de 5000 UI/L nas primeiras 72 horas pós-transplante têm significativamente menor sobrevida em 1 ano que os restantes ⁽¹⁷⁾. Álvares-da-Silva em sua tese de doutorado, analisando a influência do dano de preservação na evolução pós-operatória na primeira semana, encontrou resultados semelhantes. Igualmente, a sobrevida em 1 ano foi significativamente menor no grupo de pacientes com dano de preservação acentuado ⁽⁹⁴⁾.

4.2 Avaliação do estresse oxidativo

O EO, com a formação de ROS, gerado na reperfusão durante o TxH, vem sendo implicado em um aumento significativo de lesão do órgão ^(50,95). Consequentemente, a quantificação do EO torna-se importante para inferir o grau de disfunção hepática no período pós-operatório.

Devido ao amplo espectro de alterações induzidas pelo EO no fígado, diversas são as formas de se estimar este fenômeno, incluindo a análise da peroxidação lipídica através da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a mensuração das defesas antioxidantes (catalase e glutatona) e a avaliação da estrutura e função mitocondrial.

Entretanto, a análise do EO no contexto de TxH ainda se restringe ao campo de pesquisa experimental, mas com a perspectiva de se tornar um importante marcador clínico de I/R e rejeição no futuro.

4.3 Citocinas e moléculas de adesão

Observações prévias encontraram uma associação do I/R das CES e ativação das CK ⁽⁹⁶⁻⁹⁷⁾. Mueller *et al* demonstrou que a liberação de várias citocinas, moléculas de adesão e parâmetros da matriz extra-celular, incluindo sTNF-R2, sIL-2R, IL2, IL6, IL-8, IL-10, sVCAM-1, E-seletina, ácido hialurônico, ácido siálico, e laminina se correlaciona significativamente com a extensão do I/R ⁽⁹⁸⁾.

5. As soluções de preservação

A preservação de um órgão é a chave inicial para o sucesso do transplante. Objetiva-se manter sua viabilidade pelo maior tempo possível e assegurar o seu funcionamento imediato após o transplante ^(21,30). A

conservação em gelo é a técnica rotineiramente empregada para a preservação^(24,30), através da combinação do resfriamento da superfície do órgão e da sua perfusão com solução de preservação gelada⁽⁹⁹⁾. 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⁽¹⁰⁰⁾. Entretanto, a hipotermia também desencadeia efeitos negativos, que incluem o edema celular, pela inibição da bomba Na⁺/K⁺atpase; a acidose intracelular, por metabolismo anaeróbio, com acúmulo de lactato e dano celular; distúrbios na homeostase do cálcio citosólico; e, por fim, a geração de ROS⁽⁴¹⁾.

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 ROS, e, ainda, a manutenção do metabolismo energético da célula^(30,101).

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⁽¹⁰²⁾. A sua síntese e introdução no mercado no final dos anos 80 é considerado um dos marcos da história do procedimento⁽¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾, 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), frutose-1,6-bisfosfato (FBP), mas ainda não demonstraram sua vantagem em relação à UW⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁷⁾. O desenho da UW visa reduzir os efeitos negativos da hipotermia, combater o edema celular intersticial e a acidose, fornecendo antioxidantes e inibindo as ROS, bem como prover substratos para a reposição de ATP após a reperfusão⁽³⁰⁾. Apesar deste desenho teórico, a solução protege principalmente o enxerto contra os danos decorrentes da fase isquêmica, sendo menos protetora na reoxigenação⁽¹⁰³⁾. A sua principal ação – e o que lhe faz superior em relação a outras soluções - parece ser a capacidade de proteção endotelial⁽¹⁰⁸⁾. De fato, as CES são o alvo inicial do dano de preservação⁽¹⁰⁹⁾. Apesar disso, em 15 a 30% dos

pacientes, é detectada uma função primária do enxerto ruim atribuída ao I/R. Na Tabela 2, está detalhado o papel dos principais componentes da UW.

Tabela 2. 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
Glutaciona	Remoção de radicais livres
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 ⁽¹¹⁰⁾

6. S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC)

SNAC é um RSNO sintetizado, considerado um doador e carreador endógeno de NO quando administrado em mamíferos ⁽⁶⁹⁾. Seu uso terapêutico ainda está sob experimentação e muitos estudos indicam que ela pode ser de especial interesse no tratamento de algumas patologias. Um estudo prévio demonstrou que o tratamento com SNAC, um potente inibidor da lipoperoxidação lipídica, impede o aumento de hidroxiperóxidos no homogeinizado hepático ⁽¹¹¹⁾. Além disso, ao se analisar o perfil da expressão gênica hepática em camundongos com esteato-hepatite não-alcóolica, se

demonstrou uma expressão reduzida dos genes que participam da cadeia respiratória e dos genes responsáveis pela síntese e ação da glutathione nos animais tratados com SNAC. Isto sugere uma menor “sobrecarga” mitocondrial e uma produção reduzida de ROS, refletindo um efeito antioxidante da SNAC ⁽¹¹²⁾. Neste mesmo contexto, Andraus demonstrou em sua tese de doutorado que SNAC reduziu a lesão hepática após um período de isquemia normotérmica em fígados esteatóticos ⁽¹¹³⁾.

JUSTIFICATIVA

A preservação de um órgão é etapa essencial e indispensável ao TxH. Em 2002, Hirokawa *et al*, já afirmava “a evolução do TxH depende, hoje, mais propriamente dos progressos nos métodos de preservação de órgãos do que das técnicas de cirurgia e imunossupressão” ⁽²⁰⁾. A compreensão dos sinais precoces de dano hepático e o esclarecimento dos fenômenos intra e extracelulares envolvidos no I/R pode facilitar o desenvolvimento de mecanismos para se reduzir a lesão hepática num contexto de transplante.

Diversos são os mecanismos envolvidos no I/R hepático, incluindo a ação de ROS e distúrbios na microcirculação. O NO tem efeito controverso no I/R, mas parece melhorar a microcirculação hepática em baixas concentrações.

Considerando estes aspectos, o estudo dos efeitos da SNAC, uma solução doadora de NO, num cenário de isquemia/reperfusão hepática pode contribuir de forma significativa para o avanço nas técnicas de preservação de órgãos. De acordo com o nosso conhecimento, SNAC ainda não foi estudada em modelo experimental de isquemia a frio e reperfusão em fígado.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da SNAC após isquemia a frio e reperfusão, em relação ao dano precoce de isquemia/reperfusão em fígados de ratos.

Objetivos Específicos

a) Comparar SNAC, UW e SNAC+UW após a isquemia a frio através de variáveis bioquímicas.

b) Comparar SNAC, UW e SNAC+UW após a reperfusão através de variáveis bioquímicas e da estimativa do EO, através da mensuração de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), glutathione e catalase no tecido hepático.

c) Comparar a solução de SNAC, UW e SNAC+UW em relação ao dano mitocondrial após a reperfusão;

d) Comparar a solução de SNAC, UW e SNAC+UW em relação à expressão imuno-histoquímica de ICAM-1 e receptores de TNF α ;

e) Comparar a solução de SNAC, UW e SNAC+UW após a reperfusão através da avaliação anatomopatológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

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 530 g, procedentes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os animais foram mantidos em caixas-moradia 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.

2. Procedimentos

A perfusão e a preservação dos fígados foram realizadas com diferentes soluções, a saber: a) UW (Viaspan® Bristol-Myers-Squibb, 1000 mL), com osmolaridade de 320 mOsm/L; b) SNAC (200 nmol/L); c) SNAC+UW. A SNAC foi produzida através da S-nitrosação da N-acetilcisteína (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) em uma solução de nitrito de sódio acidificado⁽¹¹⁴⁾ (Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP-, Campinas, SP) . A solução de SNAC (0,1 mol/L) foi posteriormente diluída em solução salina a 200 nmol/L antes da administração. No grupo SNAC+UW, a solução de SNAC foi diluída com a UW a 200 nmol/L.

O procedimento experimental foi realizado conforme o modelo de reperfusão em fígados de ratos, desenvolvido por estudo anterior do grupo (Anexo 1)⁽¹¹⁵⁾. Brevemente, este modelo é dividido em três etapas sequenciais: 1) hepatectomia (“explante”); 2) estocagem a frio (2-4° C) em uma das soluções de preservação por 6 horas; 3) reperfusão *ex-situ* do fígado preservado com o sangue de outro rato (“rato receptor”) durante 15 minutos (Figura 3). Durante o experimento, o anestésico utilizado foi o isoflurano a 1,5% (Isoflurano®,

Laboratório Abbott) por via inalatória. Os animais nos quais houve algum problema de técnica cirúrgica, não foram incluídos na análise dos resultados e foram substituídos.

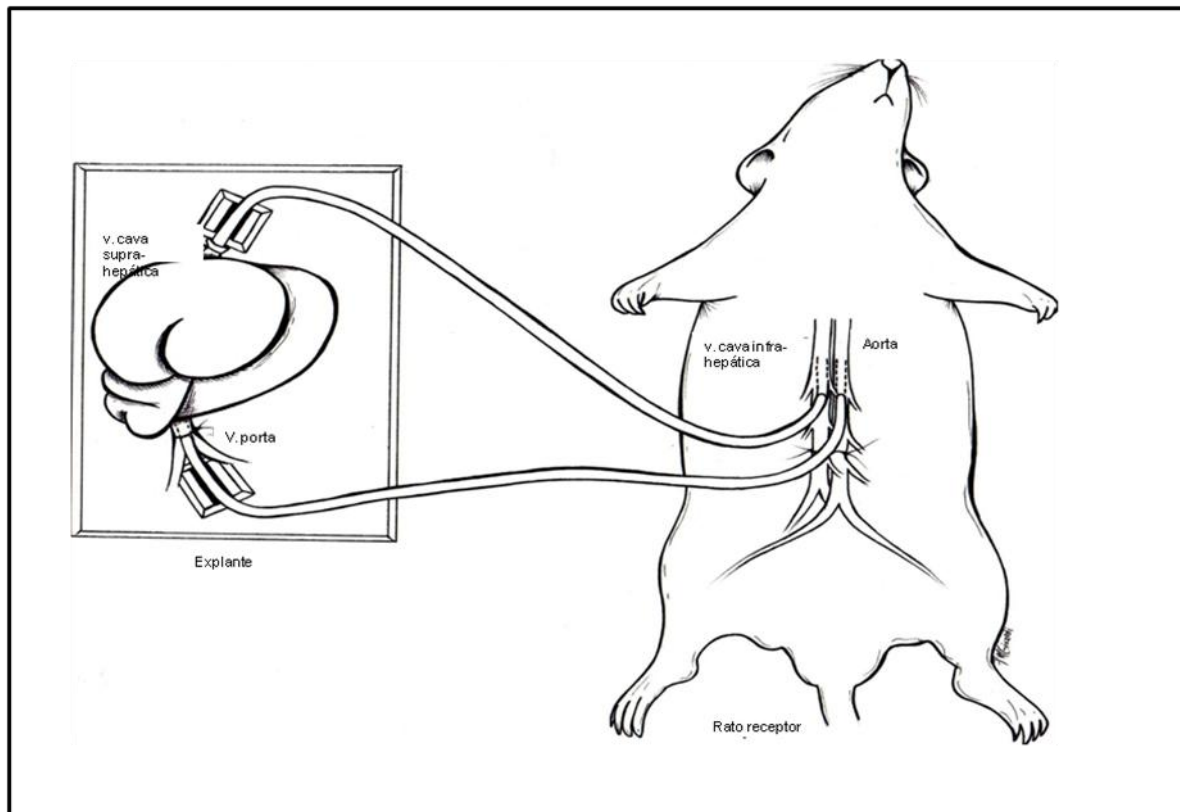


Figura 3: Esquema simplificado do modelo de reperfusão (Adaptado de Pinto Kuel *et al*, 2007) ⁽¹¹⁵⁾.

Durante o período de isquemia a frio, foram retiradas alíquotas da solução de preservação em 2, 4 e 6 horas para a determinação de AST, ALT e LDH; e, após a reperfusão, foi coletada amostra sanguínea do rato receptor através de punção cardíaca também para a dosagem destas enzimas (em analisador Roche-Hitachi®, com reagentes da *Roche Diagnostics*®).

Adicionalmente, foram seccionados fragmentos do fígado reperfundido para as seguintes finalidades: 1) dosagem das TBARS, catalase, e glutatona; 2) análise histopatológica; 3) determinação da expressão de ICAM-1 e do receptor 2 de TNF α (TNF-R2) por imuno-histoquímica; e 4) avaliação mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão.

3. Dosagem de TBARS, catalase e glutathiona no tecido hepático

Para a medida das TBARS, o fragmento hepático foi aquecido com ácido tiobarbitúrico 0,67% e ácido tricloroacético 10% por 15 minutos em banho-maria, sendo a amostra posteriormente refrigerada e centrifugada. O produto corado foi quantificado por espectrofotometria em 535nm, através da técnica descrita por Halliwell & Gutteridge ⁽¹¹⁶⁾.

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 ⁽¹¹⁷⁾.

O nível de glutathiona reduzida no tecido hepático foi avaliado através de uma reação com DTNB (*5-5'-dithiobis 2-nitro-benzoic acid*) ⁽¹¹⁸⁾.

4. Análise Histológica

Fragmentos do tecido foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, seccionados a 3 µm, e processados em coloração de hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica. As variáveis foram analisadas por método semi-quantitativo por 2 patologistas, conforme a especificação a seguir: i) esteatose macro e microgoticular:- 0: <5% hepatócitos; 1: 6-33% hepatócitos; 2: 34-66% hepatócitos; 3: > 66% hepatócitos; ii) balonamento hepatocitário- 0: ausente; 1: leve e focal; 2: leve e generalizado; 3: intenso; iii) neutrofilia- 0: ausente; 1: focal (poucas zonas 3); 2: na maioria das zonas 3; 3: presença de agregados neutrocitários; iv) congestão sinusoidal-0: ausente; 1: focal (alguns ácidos); 2: generalizada; 3: dilatação da vênula hepática terminal; v) necrose-0: ausente; 1: perivenular mínima; 2: perivenular leve.

5. Imuno-histoquímica

A expressão de ICAM-1 e TNF-R2 no tecido hepático após a reperfusão foi detectada por imuno-histoquímica (Santa Cruz Biotechnology, INC.). Dois patologistas independentes analisaram as reações. Nos casos divergentes, as amostras eram reavaliadas, sendo encontrado um consenso. Uma escala semi-

quantitativa foi utilizada para análise: 0- ausência de expressão; 1- positividade focal; 2- positividade difusa.

6. Microscopia Eletrônica

A ultraestrutura das mitocôndrias foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Foram retirados fragmentos aleatórios do lobo direito e esquerdo do fígado reperfundido para avaliação mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram desidratadas, embebidas e inclusas em resina Epon 812. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e nitrato de chumbo. Posteriormente, as amostras foram examinadas utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL-JEM 2010 (200 KeV). Os procedimentos foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

A ultraestrutura das mitocôndrias foi avaliada de acordo com o seguinte escore previamente descrito ⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾: 0- normal; 1- cristas proeminentes; 2- edema / intumescimento mitocondrial; 3- agrupamento de material amorfo.

7. Tamanho da amostra

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

8. Análise Estatística

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

ASPECTOS ÉTICOS

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

Atendendo a decreto que estipula ser o exercício da medicina de animais de laboratório atividade profissional privativa do Médico Veterinário - Decreto Lei 64.704 de 17/06/1969 (Capítulo II, Art. 2º, itens “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 de Médico Veterinário responsável pela UEA.

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados em *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals – ILAR/EUA* e Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil), em acordo com o *Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela *International Association for the Study of Pain (IASP)*. Estas diretrizes obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*)¹¹⁵.

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

FINANCIAMENTO

A realização deste trabalho totalizou R\$ 11644,00 (Onze mil, seiscentos e quarenta e quatro reais). As fontes financiadoras foram o FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) do HCPA; verba do Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com uma bolsa de doutorado.

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

RESULTADOS

Foram utilizados para a reperfusão 15 fígados: 5 no grupo UW; 5 no grupo SNAC; e 5 no grupo SNAC + UW, perfazendo um total de 30 ratos.

O peso do doador, o tempo de cirurgia do explante e o tempo de isquemia a quente foram semelhantes entre os grupos (tabela 3).

Tabela 3: Características do procedimento: peso do doador, tempo de retirada do órgão, tempo de isquemia a quente.

	UW (n=5)	SNAC (n=5)	SNAC+UW (n=5)	
Peso doador (g)	404 (\pm 83)	441 (\pm 53)	414 (\pm 88)	p= 0,74
Tempo de retirada (min)	51 (\pm 11)	44 (\pm 12)	38 (\pm 09)	p= 0,22
Isquemia a quente (min)	66 (\pm 13)	52 (\pm 13)	53 (\pm 10)	p= 0,17

Os dados estão expressos como média (\pm desvio padrão). Análise pelo ANOVA, considerando-se significante um $p < 0,05$.

1. Preservação a frio

Durante a preservação a frio, a liberação de AST e LDH no grupo da SNAC foi significativamente menor em relação ao grupo da UW e SNAC+UW ($p= 0,004$ e $p= 0,03$, respectivamente). Os níveis de ALT foram comparáveis entre os grupos ($p= 0,053$) (Tabela 4, Figura 4).

Tabela 4: Dosagem de AST, ALT e LDH no líquido de preservação nos grupos UW, SNAC e SNAC+UW.

	UW (n=5)	SNAC (n=5)	SNAC+UW (n=5)	
AST -2h	270 (\pm 131)	54 (\pm 53)	127 (\pm 66)	
4h	369 (\pm 108)	59 (\pm 52)	208 (\pm 132)	
6h	297 (\pm 88)	56 (\pm 51)	206 (\pm 77)	$p= 0,004$
ALT-2h	265 (\pm 161)	48 (\pm 51)	129(\pm 107)	
4h	322 (\pm 131)	52 (\pm 49)	217 (\pm 211)	
6h	263 (\pm 90)	51 (\pm 51)	194 (\pm 100)	$p=0,053$
LDH-2h	1776 (\pm 1086)	309 (\pm 261)	923 (\pm 465)	
4h	2265 (\pm 1267)	344 (\pm 259)	1220 (\pm 455)	
6h	1785 (\pm 807)	336 (\pm 264)	1448(\pm 522)	$p= 0,03$

Os valores estão expressos como média (\pm desvio padrão). Análise pelo ANOVA para medidas repetidas, considerando-se significativa um $p<0,05^*$. Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L.

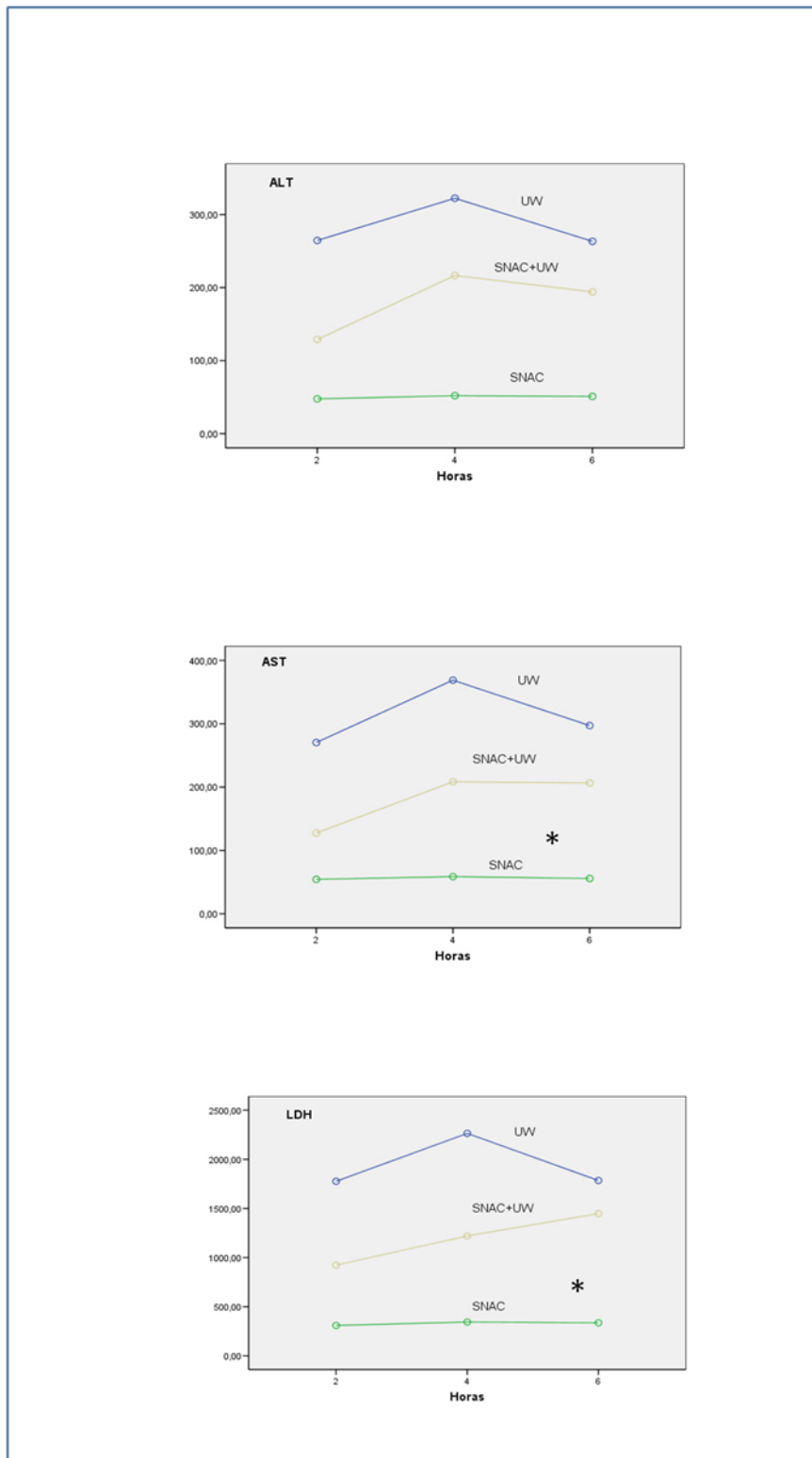


Figura 4. Níveis de AST, ALT e LDH no líquido de preservação (UW, SNAC e SNAC+UW). Análise pelo ANOVA para medidas repetidas, considerando-se significativo um $p < 0,05^*$. Onde AST= aspartato aminotransferase, em UI/L; ALT= alanina aminotransferase, em UI/L; LDH= lactato desidrogenase, em UI/L.

2. Reperusão

Após a reperusão, os níveis séricos das enzimas hepáticas (AST, ALT e LDH), das TBARS e da catalase não diferiram entre os grupos. Comparado ao grupo UW, as concentrações de glutathione foram menores nos grupos SNAC e SNAC+UW ($p= 0,006$ e $p= 0,01$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5: Medidas de AST, ALT, LDH, TBARS, catalase e glutathione após a reperusão nos 3 grupos experimentais.

	UW (n=5)	SNAC (n=5)	SNAC+UW (n=5)	<i>p</i>
ALT (UI/L)	742 (± 296)	962(± 611)	1003 (± 1161)	0.7
AST (UI/L)	959 (± 466)	1153(± 694)	823 (± 644)	0.8
LDH (UI/L)	6251 (± 2276)	7549 (± 2921)	7360 (± 6119)	0.9
TBARS (nmol/L/g fígado)	45.2 (± 14.3)	52.2(± 13.5)	47.6 (± 25)	0.8
Catalase (U/min/mg)	80.4 (± 14.7)	102.3 (± 69.5)	181.8 (± 71.4)	0.07
Glutathione (nmol/L/g fígado)	6841 (4291-15645)	680 (250-1075.5)	2047 (806.5-2299.5)	<0.001*

Os valores de glutathione estão expressos em mediana (intervalo interquartil)- teste de Kruskal-Wallis. As outras variáveis estão descritas como média \pm desvio-padrão (ANOVA para medidas repetidas). Foram realizadas comparações múltiplas Considerou-se significativo um $p < 0,05^*$.

3. Histologia

Nos 3 grupos, não foram encontrados sinais de dano de preservação. Balonização hepatocitária leve focal (Figura 5) e congestão sinusoidal focal (Figura 6) foram documentadas em todas as amostras. Em 2 fígados do grupo UW (n=2) e em 1, no grupo SNAC+UW (n=1), observou-se esteatose em menos de 30% dos hepatócitos. Necrose focal foi detectada em 2 fígados preservados com SNAC.

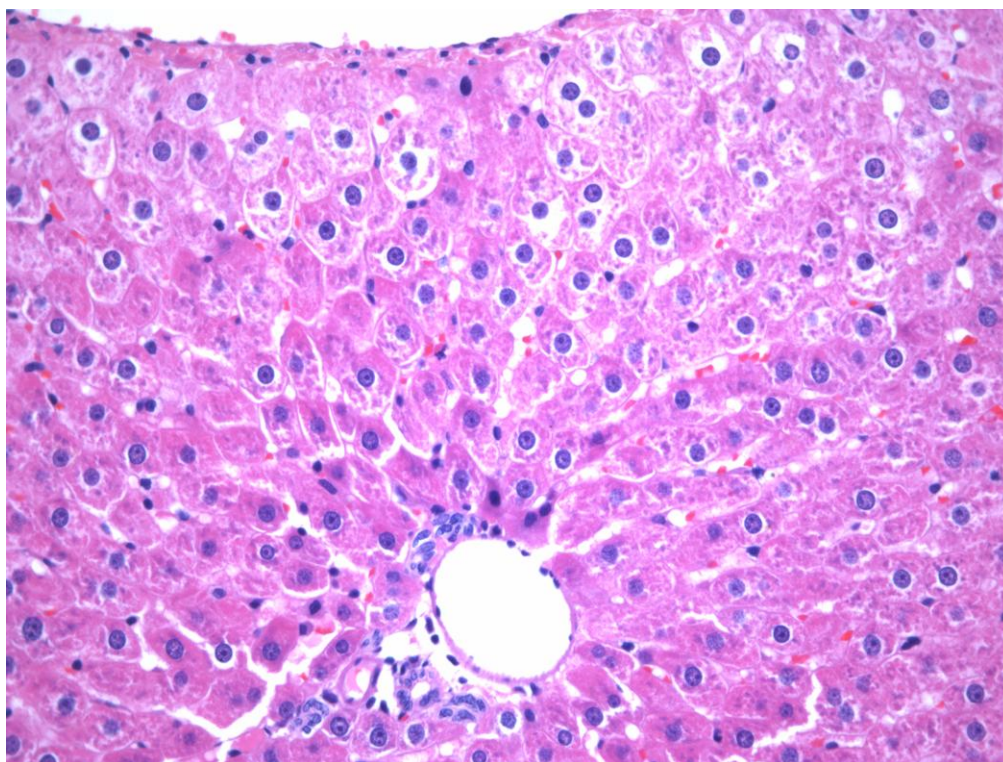


Figura 5. Balonização hepatocitária focal, documentada em todos os fígados analisados. Histologia. HE, 200x.

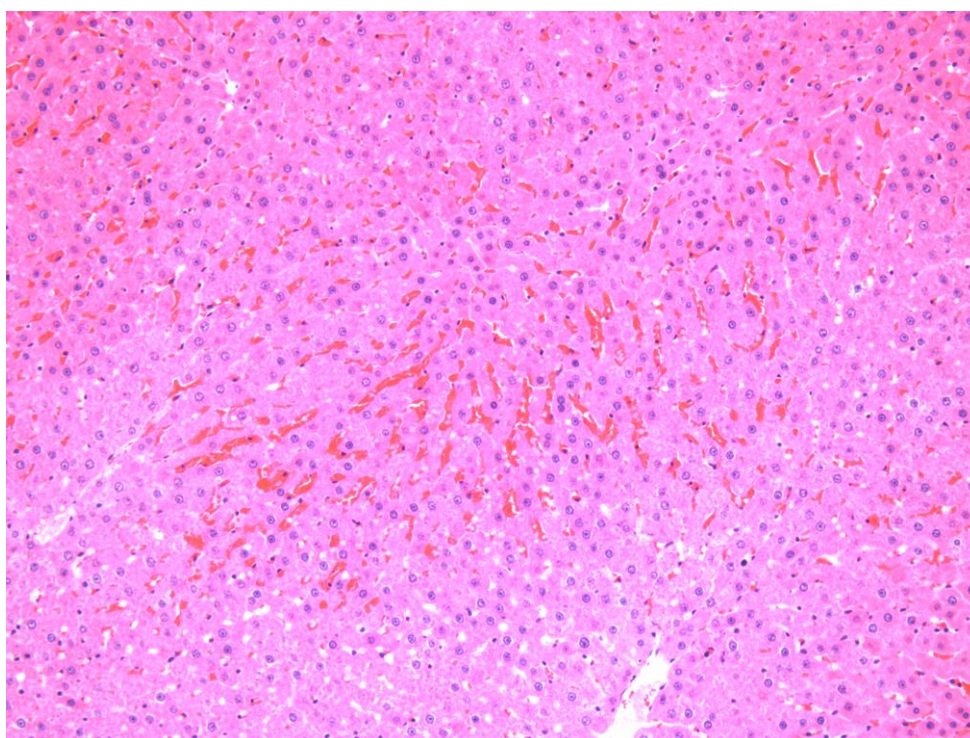


Figura 6. Congestão hepática leve focal, que ocorreu em todos os fígados analisados. Histologia. HE, 50x

4. Imuno-histoquímica

A expressão de ICAM-1 e TNF-R2 não foi detectada em nenhuma amostra estudada. Nas Figuras 7 e 8, está representado um exemplo de cada kit de imuno-histoquímica (no estudo e um controle positivo).

5. Microscopia eletrônica

Em todas as amostras estudadas, foi encontrada a mesma imagem, representada na Figura 9, onde as mitocôndrias aparecem com sua membrana destruída, com extravasamento do conteúdo intra-mitochondrial para dentro do citoplasma celular. Tais achados são compatíveis com má preservação / fixação dos fragmentos hepáticos.

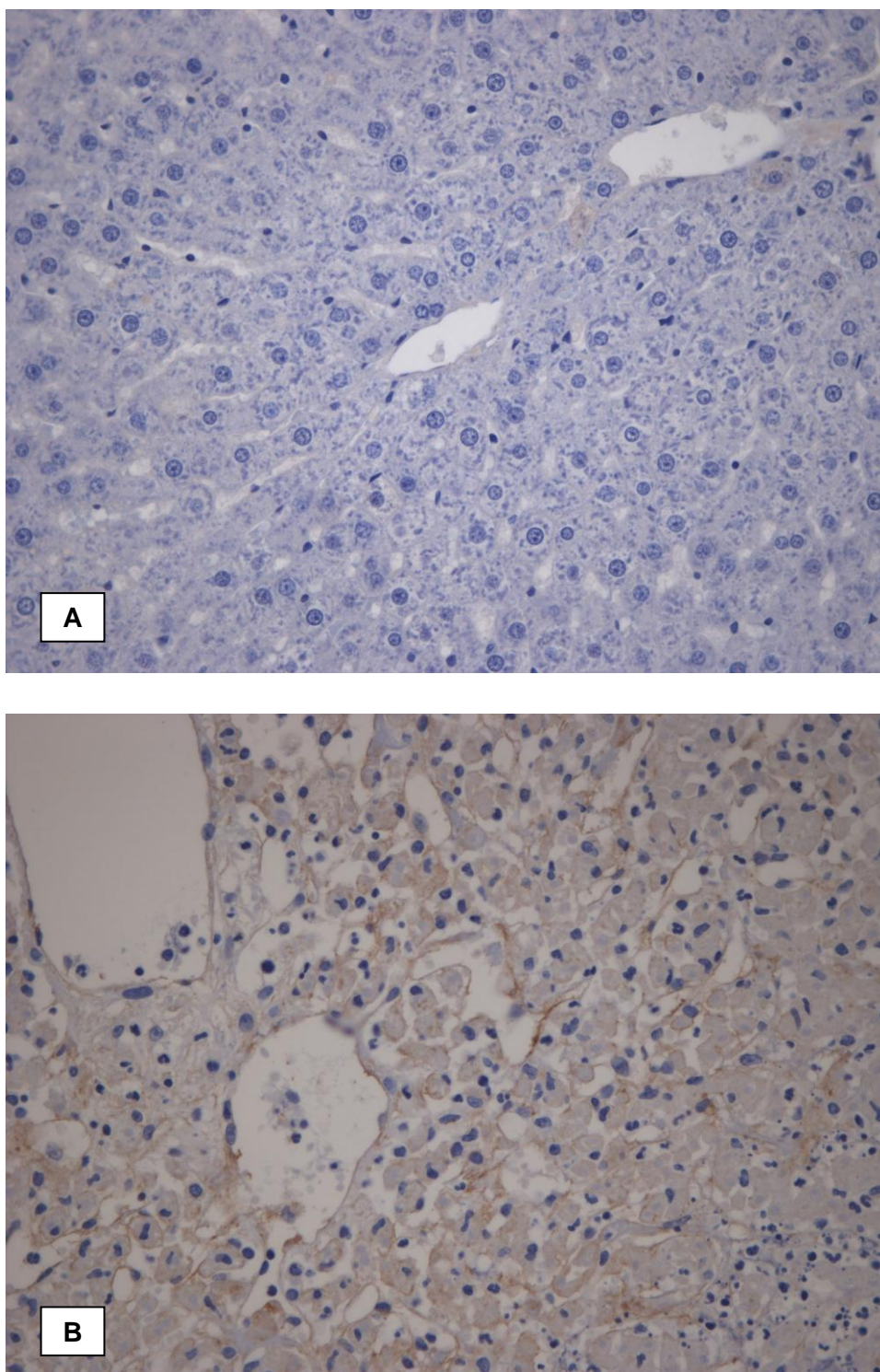


Figura 7. Imuno-histoquímica da expressão de ICAM-1 no estudo (A) e no controle positivo (B). Histologia. 400X

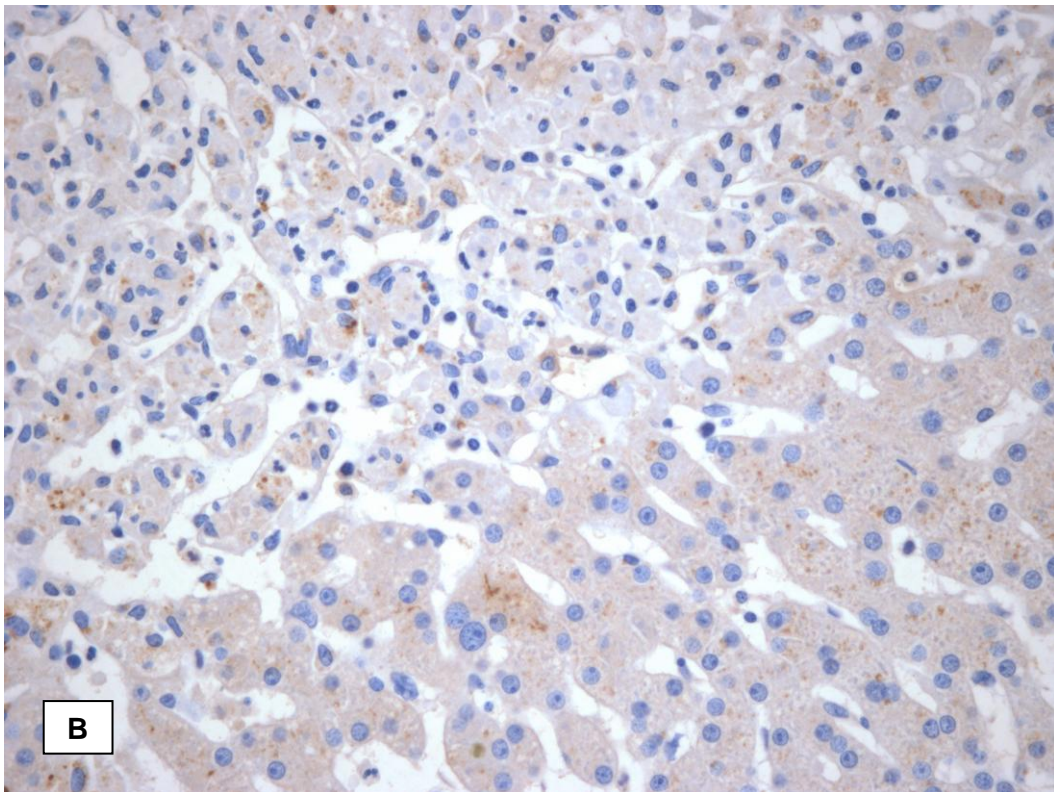
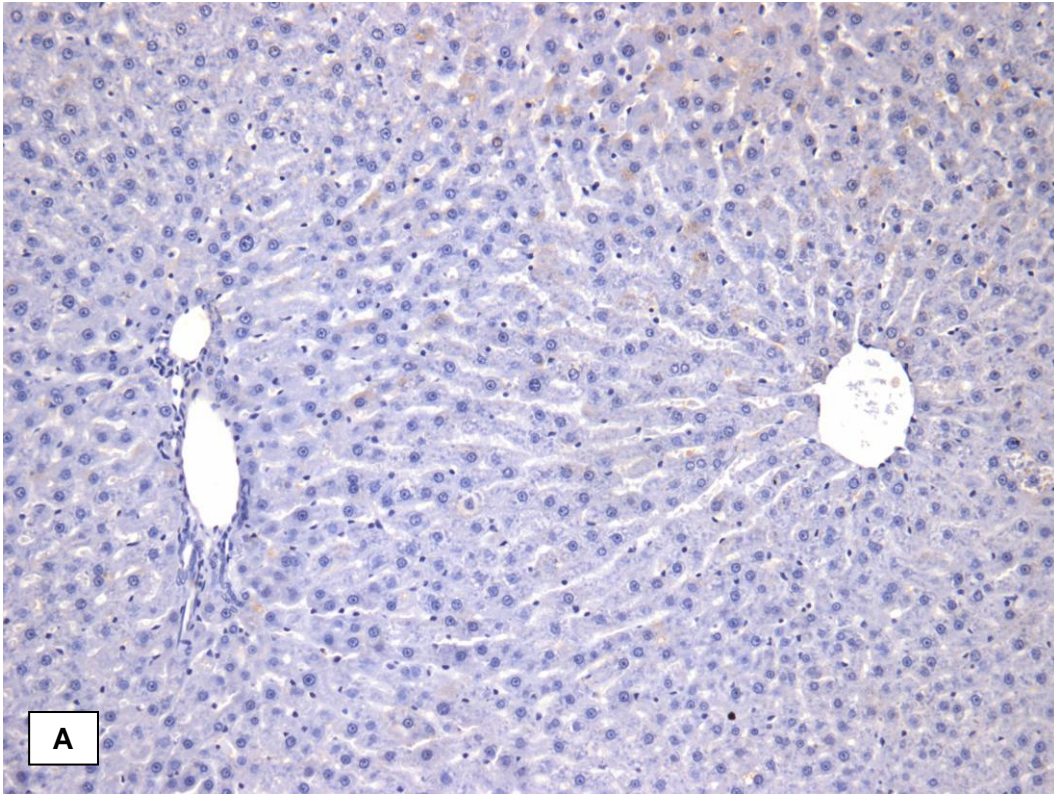


Figura 8. Imuno-histoquímica da expressão de TNF-R2 no estudo (A) e no controle positivo (B). Histologia. 400X

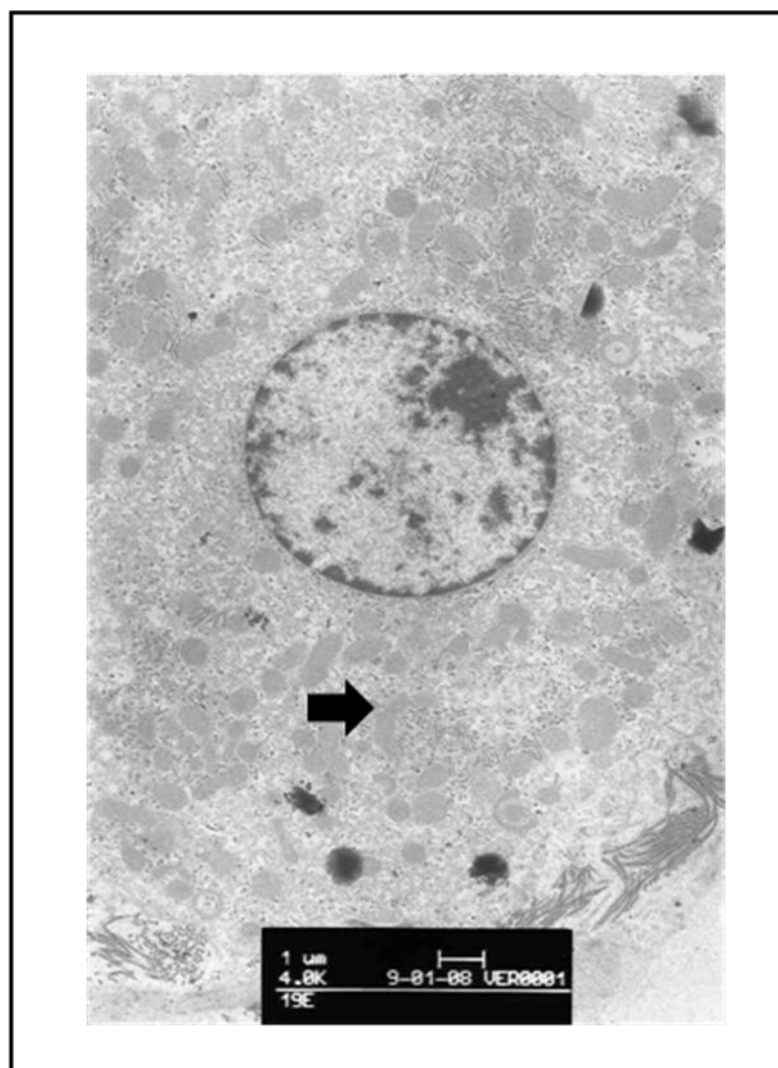


Figura 9. Foto representativa da ultraestrutura mitocondrial das amostras hepáticas estudadas. A Micrografia eletrônica demonstrou as mitocôndrias em diversos formatos, com membrana danificada e extravasamento de seu conteúdo (^X4000).

DISCUSSÃO

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

O I/R decorrente do TxH contribui para graves complicações nos fígados transplantados como não função primária, disfunção primária e estreitamentos biliares não-anastomóticos⁽¹²²⁾. Estas complicações permanecem um importante problema na prática clínica, de forma que a redução de seus efeitos pode aumentar tanto o número de enxertos como o de pacientes que se recuperam adequadamente do transplante. O TxH em adultos iniciou no HCPA em 1996. Tendo por base estes anos de experiência clínica, as muitas perguntas deles decorrentes, e as dúvidas ainda existentes na literatura, foi montada uma linha de pesquisa experimental em isquemia/reperfusão hepática, com o intuito de averiguar intervenções que pudessem minimizar o I/R. É nesta linha que este estudo se insere.

O principal foco foi, desde o início, o estudo de novas soluções de preservação, haja vista que é na preservação de órgãos onde se encontra o maior espaço para se aprimorar os resultados do TxH. A solução mais utilizada para a preservação de fígados para transplante é a UW. Porém, ela ainda não é a ideal por apresentar custo elevado, alta viscosidade, e não impedir a disfunção primária do enxerto⁽¹⁰²⁾. Em 2004, no nosso meio, Moresco *et al* estudaram fígados de ratos submetidos a um período de 24 horas de isquemia a frio e compararam 3 soluções (FBP, UW e UW acrescida de FBP), concluindo que a preservação hepática foi melhor no grupo da FBP, um intermediário da rota glicolítica^(126, 129-130). Faltava saber, então, se este benefício se mantinha após a reperfusão. Pareceu-nos natural juntar esforços na tentativa de responder a esta questão.

Enquanto eram iniciados os trabalhos na busca de um modelo de reperfusão hepática que incluísse as três fases que se sucedem em um TxH: isquemia a frio, isquemia a quente e reperfusão, o grupo, composto de alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica, passou a estudar o efeito do

estado nutricional e da idade do doador na isquemia a frio, comparando UW e FBP e os efeitos dos anestésicos inalatórios isoflurano e sevoflurano na qualidade do fígado do doador ⁽¹⁴⁹⁾, sugerindo que a FBP possuía um papel interessante na preservação a frio. O novo modelo de reperfusão foi concluído, após muitos experimentos, e seus resultados foram publicados em 2007 ⁽¹¹⁵⁾. Com a utilização deste novo modelo pode ser realizado um estudo comparativo entre UW e FBP, cujos resultados demonstraram que novamente a FBP foi superior a UW na preservação a frio, confirmando os achados de Moresco *et al* ⁽¹²⁶⁾, mas este efeito não se manteve após a reperfusão, quando a solução padrão foi mais efetiva. Quando analisados estudos experimentais publicados acerca da comparação da UW a outras soluções (Tabela 6), vemos que, apesar das limitações conhecidas da solução padrão, ainda não se identificou uma substância que a substitua na preservação de órgãos, de forma que os estudos neste campo de pesquisa ainda são bastantes desafiadores. Um achado interessante foi que a FBP demonstrou certa proteção mitocondrial após a reperfusão ⁽¹⁰⁷⁾. Isto suscitou algumas outras questões: abandonar o estudo da FBP como solução de preservação? Testar outro modelo de reperfusão? Avaliar o estímulo à fibrogênese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias? Procurar novos agentes que possam ser utilizados como solução de preservação hepática? E por que não focar o desequilíbrio que ocorre entre endotelinas e NO após a reperfusão? Por que não estudar o papel de drogas doadoras de NO em um cenário de isquemia/reperfusão hepática?

Assim, dois novos estudos foram iniciados, focando o uso de uma droga doadora de NO, a SNAC, na preservação hepática em ratos, visando avaliar SNAC na prevenção do I/R; comparar SNAC com UW e FBP; e avaliar a associação SNAC + UW. Este é um dos estudos.

Tabela 6: Estudos experimentais com diferentes soluções de preservação em comparação com UW.

ESTUDO	SOLUÇÃO	ANIMAL	PROCEDIMENTO	RESULTADOS
Ferrigno et al, 2008 ⁽¹²³⁾	Celsior	Ratos Wistar	Isquemia a frio por 18 e 48h	Celsior equiparável à UW até 18h de preservação a frio. UW superior a Celsior após 48 h de isquemia a frio
Ben Mosbah et al, 2006 ⁽¹²⁴⁾	IGL-1	Ratos Zucker	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit <i>like</i> (com adição de albumina 5%)	IGL-1 melhor que UW
Ben Abdennebi et al, 2006 ⁽¹²⁵⁾	IGL-1	Suíños	Transplante hepático	IGL-1 melhor que UW
Cheng et al, 2005 ⁽¹⁰⁶⁾	CMU-1	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit	CMU-1 semelhante à UW
Fraga, 2005 ⁽¹⁰⁷⁾	FBP	Ratos Wistar	Preservação a frio- 6h, seguido de reperfusão com sangue por 15 min	FBP inferior à UW, mas com maior proteção mitocondrial que UW
Moresco et al, 2004 ⁽¹²⁶⁾	FBP	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas	FBP melhor que UW
Bessemis et al, 2004 ⁽¹²⁷⁾	Hipotermosol	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit	Hipotermosol tão efetivo quanto UW
Straatsburg et al, 2002 ⁽¹²⁸⁾	HTK Celsior	Ratos Wistar	Preservação a frio- 24 horas, seguido de perfusão com solução de Krebs-Henseleit	Celsior e UW igualmente efetivas, sendo o efeito da HTK inferior

CMU-1= solução da Universidade de Medicina da China; IGL-1= solução do Instituto Georges Lopez;

FBP= frutose-1,6-bisfosfato; HTK= histidina-triptofano-cetoglutarato

2. Em relação ao desenho do estudo

O TxH ortotópico em ratos é uma técnica muito utilizada no contexto de pesquisa. Os ratos apresentam algumas vantagens sobre outros animais devido a sua ampla viabilidade e baixo custo, apesar de ser requerido vasto treinamento técnico ⁽¹³¹⁾. O modelo de reperfusão utilizado neste trabalho foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa como substitutivo ao transplante completo e com a finalidade de se estudar intervenções para amenizar o I/R ⁽¹¹⁵⁾. Este modelo se distancia do TxH e apresenta algumas limitações. A opção por utilizá-lo deveu-se ao fato dele incluir isquemia a frio, isquemia a quente e reperfusão, ao contrário de muitos estudos que avaliam I/R após isquemia normotérmica ⁽¹³²⁻¹³⁴⁾. Quando se deseja estudar soluções de preservação, é interessante que seja incluído um período de isquemia a frio, pois a hipotermia, apesar de essencial para a preservação de órgãos, ocasiona também efeitos negativos sobre o enxerto ⁽⁴¹⁾. A principal limitação deste modelo consiste no curto período de reperfusão, padronizado em 15 minutos por ser este o tempo em que se consegue manter adequada estabilidade hemodinâmica no rato receptor ⁽¹¹⁵⁾. No entanto, 15 minutos de reperfusão podem ser suficientes, pois os mecanismos de rejeição, embora pouco evidentes, já foram desencadeados ^(55,135).

Muitos estudos experimentais em TxH utilizam animais isogênicos. Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar pelos motivos expostos a seguir: a) no Brasil, as fontes de animais isogênicos são escassas; b) os ratos isogênicos apresentam alto custo; c) os ratos Wistar, apesar de não idênticos, são geneticamente semelhantes devido a sua consanguinidade; e, por fim, d) o tempo de reperfusão de 15 minutos é curto para ocasionar rejeição. Neste último quesito, é interessante fazer analogia a estudos experimentais em modelos de transplante renal em ratos Wistar, em que, embora a pressão para a rejeição seja maior, por características inerentes ao órgão, os imunossuppressores podem ser dispensados nos primeiros 7 dias após o procedimento ⁽¹³⁶⁾.

Neste trabalho, foi estudada a solução de SNAC a 200 nmol/L em comparação a UW e SNAC+UW na isquemia a frio e após reperfusão de fígados de ratos. SNAC é uma droga doadora de NO ⁽⁶⁹⁾ e potente inibidora da

lipoperoxidação lipídica ⁽¹¹¹⁾, que tem sido estudada em cenários experimentais diversos, tais como hipertensão ⁽¹¹⁴⁾, hipercolesterolemia ⁽¹³⁷⁾, e na doença hepática gordurosa não alcoólica ^(111-112,138). Além disso, já foi estudada em modelos de isquemia/reperfusão de músculo esquelético ⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾ e em fígados esteatóticos, com bons resultados ⁽¹¹³⁾. Desta forma, estas características levam a suposição de que SNAC poderia ser útil na preservação de órgãos para transplante, e embasam seu uso em modelos de isquemia/reperfusão.

Em relação à escolha das variáveis, foram dosadas AST, ALT e LDH, conhecidos marcadores de dano hepatocelular ⁽¹⁴²⁾. Durante a isquemia a frio do fígado doado para transplante, a liberação destas enzimas no líquido de preservação está relacionada ao grau de lesão hepatocelular mesmo quando ainda não ocorreram alterações anatomopatológicas ⁽⁹²⁻⁹³⁾. Da mesma forma, elevados níveis de aminotransferases, especialmente de AST, no período imediato pós-transplante se correlacionam com a não função primária do enxerto ⁽¹⁷⁾, sendo um dos importantes parâmetros utilizados em TxH para se estimar a intensidade do dano de preservação ^(17,94).

O EO vem sendo apontado como um dos principais fatores responsáveis pelo dano ao enxerto. Desta forma, a quantificação dos ROS e de substâncias antioxidantes torna-se um importante parâmetro para inferir a viabilidade do órgão pós-transplante ⁽¹⁴³⁻¹⁴⁶⁾. Sua aplicação, contudo, ainda se restringe à pesquisa, não sendo empregada na prática clínica. Neste estudo, foram analisados quatro parâmetros de EO: TBARS, catalase, glutathiona e avaliação da ultraestrutura mitocondrial.

Ao término da reperfusão, foram realizadas biópsias hepáticas. O principal papel da análise histológica neste estudo consiste em demonstrar a homogeneidade das amostras e a efetividade da reperfusão, uma vez que é esperado que 15 min não sejam suficientes para desencadear infiltrado inflamatório ou outras alterações sugestivas de dano de preservação ⁽²¹⁾. Por fim, a avaliação por imuno-histoquímica da expressão de ICAM-1 e do receptor de TNF, dois importantes marcadores de resposta inflamatória ⁽⁵⁵⁾, teve como objetivo detectar alterações precoces secundárias à isquemia/reperfusão, da mesma forma como a análise da ultraestrutura mitocondrial em microscopia

eletrônica de transmissão. As mitocôndrias são a principal organela envolvida em um processo de EO, e alterações em sua morfologia e função consistem em um dos indícios iniciais de dano celular em um processo de isquemia/reperfusão (55-58).

3. Em relação aos resultados durante isquemia a frio

Discutir os achados obtidos neste estudo não é uma tarefa fácil, especialmente quando se considera que discutir é comparar os resultados de um dado experimento com resultados de experimentos semelhantes de outros grupos. Como, em extensa revisão, não foram encontrados estudos de I/R envolvendo isquemia a frio e o emprego de solução de SNAC como solução de preservação para TxH, a discussão desta tese inevitavelmente sofrerá os efeitos do seu ineditismo.

No presente estudo, a solução de SNAC exerceu uma maior ação protetora sobre o órgão durante as 6 horas de preservação a frio em comparação a UW e SNAC+UW. Esta afirmativa baseia-se nos menores níveis de AST e LDH no líquido de preservação. Em relação à dosagem de ALT, apesar de não se ter encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, houve uma forte tendência da ALT também apresentar menores valores com SNAC. 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. Este comportamento é o que habitualmente ocorre em TxH (17,147).

Os achados do estudo atual reforçam a capacidade de proteção da SNAC sobre os hepatócitos expostos ao I/R, já demonstrado por Andraus em sua tese de doutorado (113). Neste último estudo, foram avaliados ratos com e sem esteatose submetidos à isquemia hepática normotérmica por 60 minutos, tratados ou não com SNAC. Foi analisado o nível das enzimas hepáticas, a histologia, a respiração mitocondrial e o EO (malondialdeído). O tratamento com SNAC não melhorou o I/R em ratos sem esteatose. Por outro lado, os ratos com esteatose tratados com SNAC apresentaram uma melhor histologia (menos hemorragia intraparenquimatosa), melhor função mitocondrial e menos EO. No trabalho atual, os fígados preservados com SNAC apresentaram uma menor

lesão hepatocelular durante a isquemia a frio, aferida pelos níveis das enzimas hepáticas no líquido de preservação, mas foi semelhante à UW após a reperfusão por parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo (TBARS, catalase) e histológicos.

O estudo em discussão embora demonstre a utilidade da SNAC na preservação a frio, não consegue avançar em aspectos mecanísticos desta proteção. De fato, o efeito da SNAC em cenários de isquemia/reperfusão, tais como em músculo esquelético e fígados esteatóticos, parece estar mais relacionado à modulação do fluxo sanguíneo e da adesão celular dentro dos vasos do que à proteção direta das células do parênquima ^(60,79,81,113,148). Portanto, a ação do NO ocorre principalmente após a reperfusão, de forma que o mecanismo protetor durante a isquemia a frio ainda é obscuro. O achado de superioridade da SNAC e FBP em relação à UW na preservação de fígados de ratos no período de isquemia a frio é intrigante, mas o desenho dos estudos não permite que sejam feitas considerações acerca dos mecanismos envolvidos. Algumas especulações, entretanto, podem ser realizadas. É conhecido que UW previne os efeitos clássicos da hipotermia (como edema celular, acidose intracelular, piora do metabolismo energético e o acúmulo de ROS), mas apresenta certas características que dificultam a preservação, como a alta viscosidade ⁽¹²⁸⁾. Acredita-se, portanto, que a menor viscosidade da SNAC e FBP seja uma das propriedades benéficas destas soluções, de forma a promover a perfusão mais homogênea do órgão, possibilitando uma maior proteção celular e endotelial. Para poder se avançar no conhecimento das propriedades e mecanismos de ação destas substâncias na preservação de fígados, são necessários estudos que comparem UW, FBP e SNAC no mesmo modelo.

Estudos anteriores do nosso grupo e de outros autores também compararam a solução de UW a outras soluções em modelos animais. Moresco e colaboradores avaliaram a utilidade de solução de FBP durante isquemia a frio em fígados de ratos, concluindo que a preservação hepática com FBP foi similar à obtida com UW ⁽¹²⁶⁾. Fraga, em sua dissertação mestrado, encontrou resultados semelhantes ⁽¹⁰⁷⁾. Mota e colaboradores analisaram a preservação de

fígados de ratos Wistar idosos durante isquemia a frio, demonstrando uma tendência da FBP ser mais protetora que a UW⁽¹⁴⁹⁾.

4. Em relação aos resultados após reperfusão

Após a reperfusão, as soluções de UW, SNAC e SNAC+UW alcançaram resultados equiparáveis em todos os parâmetros (nível sérico de transaminases, estresse oxidativo- TBARS- e histologia). Estes achados favorecem a idéia de que a SNAC desempenhou uma ação satisfatória na preservação dos fígados. Resultados similares à solução padrão devem ser festejados e, ao mesmo tempo, discutidos. SNAC já foi estudada em outros cenários de estresse oxidativo, como em ratos e camundongos com esteato-hepatite. Nestas pesquisas, demonstrou um potente efeito antioxidante através do bloqueio da peroxidação lipídica^(111-112,138). Provavelmente, este também seja um dos mecanismos de proteção da SNAC durante a preservação de órgãos. Outro dado a ser comentado é que a adição de SNAC à solução de UW não melhorou os resultados. Parece lógico que a associação das duas substâncias deveria multiplicar o efeito protetor, mas isso não ocorreu. Fato semelhante aconteceu em um estudo que comparou FBP, UW e UW+FBP durante preservação a frio de fígados de ratos. Neste último estudo a associação UW+FBP demonstrou resultados inferiores aos de cada solução isolada⁽¹²⁶⁾. Talvez, SNAC e FBP possam interagir com algum componente da complexa formulação da UW, ocasionando sua inativação. Neste sentido, Hirokawa *et al* adicionaram FBP à solução de UW após remoção de alguns componentes (glutathiona, adenosina, alopurinol e hidroxietilamido), documentando uma menor geração de citocinas pelas células de Kupffer⁽²⁰⁾. É possível que se detecte resultados melhores, se fizéssemos o mesmo com SNAC.

Não foi motivo de surpresa o fato de a dosagem de glutathiona ter sido maior no grupo de fígados preservados com solução de UW, uma vez que este é um dos componentes conhecidos desta solução⁽¹¹⁰⁾. Por outro lado, quando analisada a atividade da catalase, os fígados preservados com SNAC ou SNAC+UW exibiram tendência a uma maior atividade desta enzima, talvez como uma forma de contrabalançar uma menor concentração antioxidante na sua fórmula. Da mesma forma, Fraga, ao comparar FBP e UW como soluções de

preservação de fígados de ratos, também documentou uma maior ativação dos sistemas antioxidantes com FBP, refletida pela maior expressão da enzima catalase neste grupo ⁽¹⁰⁷⁾.

Quando avaliado o tecido hepático, não houve indícios de dano de preservação nas amostras estudadas, o que era esperado, uma vez que tais alterações costumam se tornar evidentes 60-90 minutos após a reperfusão ⁽⁵⁵⁾. Os achados histológicos foram semelhantes nos 3 grupos, com leve congestão sinusoidal, o que documenta um bom fluxo sanguíneo intra-hepático durante o processo de reperfusão, além da ausência de lesão significativa nas CES.

A expressão de moléculas de adesão tem sido reconhecida como um dos fatores indicativos de dano de preservação. Alguns experimentos estudam a expressão de ICAM-1 como a única forma de medir o grau de dano hepático. É o caso do estudo de Dalgic *et al* que avaliou a expressão de ICAM-1 da solução padrão com a de 3 tipos de UW modificada (acrescida de verapamil, nitroprussiato de sódio ou glutatona) após 16 horas de preservação a frio. Demonstrou que nos fígados preservados apenas com UW houve mínima expressão de ICAM-1 ⁽¹⁵⁰⁾. Tal achado pode ser comparado com o do atual estudo, onde não foi detectada a expressão de ICAM-1 por imuno-histoquímica em nenhuma amostra, o que pode indicar mínimo dano de preservação em todos os fígados estudados. Paralelamente, a resposta pró-inflamatória apresenta um papel crucial no I/R e pode ser mensurada através da expressão de citocinas. Em relação a isso, neste estudo, não foi detectado a expressão de TNF-R2 em nenhuma amostra, reforçando a idéia de que provavelmente ocorreu mínimo dano de preservação em todos os grupos. Além disso, a falta de expressão de ICAM-1 e TNF-R2 pode ser reflexo do modelo escolhido, que limita a reperfusão em apenas 15 minutos. Cabe ressaltar também que não havia nenhum problema técnico com os kits utilizados, os quais eram próprios para ratos, além de terem sido testados, com sucesso, em amostras- controle.

A análise da estrutura mitocondrial é outro parâmetro importante do grau de lesão no I/R. Neste sentido, ao comparar FBP e UW como soluções de preservação, Fraga, em sua tese de mestrado, avaliou as mitocôndria por espectrofotometria, documentando uma menor modificação da estrutura da

membrana mitocondrial nos fígados preservados com FBP, sugerindo um menor *swelling* ⁽¹⁰⁷⁾. Entretanto, para uma avaliação mais objetiva da integridade mitocondrial, é necessário o estudo desta organela por microscopia eletrônica. No trabalho atual, a ideia inicial seria realizar a avaliação de mitocôndrias por espectrofotometria e microscopia eletrônica, possibilitando uma comparação entre estes dois métodos. Por problemas técnicos, o espectrofotômetro não estava disponível, impossibilitando a utilização desta técnica. Por fim, na análise da ultraestrutura das mitocôndrias por microscopia eletrônica, averigou-se a presença de organelas deformadas, com ruptura de membrana e extravasamento do conteúdo interno. As amostras foram revisadas por patologista experiente, que considerou, como provável causa da inadequação das amostras para análise, ter havido fixação inadequada das peças. Este resultado adverso poderia ser evitado caso tivessem sido coletadas amostras em duplicata e/ou realizada a análise mitocondrial durante o transcorrer da pesquisa e não apenas após a coleta de todo material.

5. Limitações do estudo

Dentro das especificações deste estudo, e a luz dos resultados obtidos, devem ser discutidas algumas de suas limitações:

1) Este estudo tinha como objetivo avaliar as alterações precoces do I/R e o efeito do uso de SNAC em comparação à solução UW. A primeira questão que deve ser levantada é o tempo de reperfusão de 15 minutos. Seria ele suficiente para desencadear lesões? Talvez seja esta a principal limitação deste estudo. Assim, é possível que só fossem demonstráveis alterações muito precoces do I/R, o que poderia influenciar de forma negativa na interpretação dos resultados para os propósitos de ao menos dois dos objetivos específicos: a comparação das soluções em relação à expressão imuno-histoquímica de ICAM-1 e TNF-R2 e à análise anatomopatológica.

2) A análise da ultraestrutura mitocondrial seria um dado bastante significativo para a avaliação do papel da SNAC neste modelo de I/R. Entretanto, sendo impossível devido à má-preservação, esta se torna uma outra limitação importante do estudo, inviabilizando um dos seus objetivos e limitando os dados em relação às mais precoces alterações secundárias ao EO pelo I/R.

6. Possíveis aplicações futuras

Considerando o desenho deste estudo, seus achados e limitações, é possível que sejam consideradas algumas aplicações futuras, tanto para o modelo animal quanto para a SNAC como solução de preservação.

- a) O modelo de isquemia/reperfusão utilizado deveria ser aperfeiçoado para que o período de reperfusão fosse ampliado o mais próximo possível dos 60 minutos. Esta tarefa, no entanto, não parece fácil quando considerado o seu uso em ratos Wistar. Estratégias para controle e manutenção do estado hemodinâmico do animal seriam bem-vindas, antes que o modelo fosse aplicado a animais de maior porte, o que envolve custos mais elevados;
- b) O modelo, como está, presta-se mais a detecção de dano precoce de isquemia/reperfusão, e a tentativa de demonstração de lesão da ultraestrutura mitocondrial talvez deva ser novamente perseguida;
- c) A análise do perfil da expressão gênica em fígados preservados com UW e SNAC pode um ser campo interessante de pesquisa, podendo contribuir na compreensão dos mecanismos de ação de tais soluções;
- d) Não se pode desprezar o achado de que a solução de SNAC foi superior à UW na preservação a frio. Isto sugere que a droga tenha um papel que deve ser testado futuramente em modelos de transplante hepático em animais;
- e) SNAC também foi útil na preservação, sendo comparável a UW. Testar diferentes concentrações de SNAC adicionada à UW talvez pudesse trazer resultados interessantes;
- f) Estudos com acompanhamento pós-operatório dos animais submetidos a transplante parecem ser necessários para que se tenha um cenário mais próximo à realidade clínica e para que se possa estimar o efeito da SNAC nas fases de isquemia e reperfusão, e seu papel no alívio das lesões inerentes ao TxH, bem como avaliar o seu uso em modelos de simulação de complicações vasculares que costumam ocorrer no pós-transplante.

CONCLUSÕES

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

- 1) SNAC foi efetiva em reduzir o dano precoce de isquemia/reperfusão em fígados de ratos;
- 2) A solução de SNAC foi superior à UW e SNAC+UW na preservação a frio de fígados de ratos, através da avaliação por variáveis bioquímicas;
- 3) Após a reperfusão, UW, SNAC e SNAC+UW alcançaram resultados semelhantes, através de variáveis bioquímicas, mensuração de TBARS e catalase. No entanto, o nível de glutathione foi maior nos fígados de ratos preservados com UW;
- 4) A comparação entre as três soluções no aspecto referente à ultraestrutura mitocondrial não pode ser realizada, por falha na técnica escolhida para a preparação do material;
- 5) Não houve expressão imuno-histoquímica de ICAM-1 e de TNF-R2 no tecido hepático nos fígados preservados com SNAC, UW e SNAC+UW;
- 6) Não foram encontradas alterações anatomopatológicas sugestivas de dano de isquemia/reperfusão após a restauração do fluxo sanguíneo em fígados de ratos preservados com qualquer uma das três soluções.

Em resumo, SNAC foi superior à UW na preservação a frio de fígados de ratos, e seu emprego alcançou resultados similares àquela na reperfusão sanguínea no modelo estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wiesner RH. Current indication, contraindications and timing for liver transplantation. In: Busuttil RW, Klintmalm GB. Transplantation of the liver. Company WS, Philadelphia, 1996.
2. Busuttil RW, Farmer DG, Yersiz H, *et al.* Analysis of long-term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single-center experience. *Ann Surg* 2005; 241 (6): 905.
3. 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 (11): 1370.
4. McCormick A, Sultan J. Liver transplantation--patient selection and timing. *Med J Malaysia* 2005; 60 Suppl B: 83.
5. Morioka D, Takada Y, Kasahara M, *et al.* Living donor liver transplantation for noncirrhotic inheritable metabolic liver diseases: impact of the use of heterozygous donors. *Transplantation* 2005; 80 (5): 623.
6. Otte JB, de Ville de Goyet J, Reding R. Liver transplantation for hepatoblastoma: indications and contraindications in the modern era. *Pediatr Transplant* 2005; 9 (5): 557.
7. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Disponível em <http://www.abto.com.br>. Último acesso em outubro de 2009.
8. United Network for Organ Sharing. Disponível em <http://www.unos.org>. Último acesso em outubro de 2009.
9. Norman DJ. Allocation of livers for liver transplantation: ethics and politics. *Clin Liver Dis* 1997; 1 (2): 281.
10. Bosch X. Spain rejects "social" reasons to deny access to transplantation. *Lancet* 1999; 354 (9188): 1454.
11. Jiménez Romero C MGE, Colina Ruíz F, Palma Carazo F, Loinaz Segurolo C, Rodríguez González F, González Pinto I, García García I, Rodríguez Romano D, Moreno Sanz C. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation* 1999; 68 (4): 572.
12. Melendez HV, Heaton ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation* 1999; 68 (4): 469.
13. McMaster P, Vadeyar H. Criteria for liver graft allocation in the era of organ shortage. *Acta Chir Belg* 2000; 100 (6): 285.

14. Renz JF, Kin C, Kinkhabwala M, *et al.* Utilization of extended donor criteria liver allografts maximizes donor use and patient access to liver transplantation. *Ann Surg* 2005; 242 (4): 556.
15. Steinbrook R. Public access to NIH-funded research. *N Engl J Med* 2005; 352 (17): 1739.
16. De Carlis L, Sansalone CV, Rondinara GF, *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.
17. Rosen HR, Martin P, Goss J, *et al.* Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation. *Transplantation* 1998; 65 (1): 68.
18. Mueller AR, Platz KP, Krause P, *et al.* Is the use of marginal liver grafts justified? *Transplant Proc* 1999; 31 (1-2): 401.
19. Mirza DF, Gunson BK, Da Silva RF, Mayer AD, Buckels JA, McMaster P. Policies in Europe on "marginal quality" donor livers. *Lancet* 1994; 344 (8935): 1480.
20. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; 74 (6): 779.
21. Gaffey MJ, Boyd JC, Traweek ST, *et al.* Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25 (1): 184.
22. Wang L, Florman S, Roayaie S, *et al.* Differential in vivo recovery of sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. *Transplantation* 1998; 66 (5): 573.
23. 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 (2): 154.
24. Strasberg SM. Preservation injury and donor selection: it all starts here. *Liver Transpl Surg* 1997; 3 (5 Suppl 1): S1.
25. Rosen HR, Madden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology* 1999; 29 (2): 365.
26. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108 (1): 252.
27. Bronk SF, Gores GJ. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 1991; 14 (4 Pt 1): 626.

28. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992; 267 (10): 6654.
29. Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 1999; 248 (1): 280.
30. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45 (4): 673.
31. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30 (8): 4217.
32. Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 1992; 79 (4): 310.
33. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997; 8 (2): 86.
34. Baron PW, Sindram D, Higdon D, et al. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6 (4): 407.
35. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229 (1): 264.
36. Peralta C, Bulbena O, Bargallo R, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2000; 70 (12): 1761.
37. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32 (2): 169.
38. Bilzer M, Witthaut R, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of ischemia/reperfusion injury in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1994; 106 (1): 143.
39. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284 (1): G15.
40. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997; 100 (2): 279.
41. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003; 125 (3): 917.

42. Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006; 79 (20): 1881.
43. Massip-Salcedo M, Rosello-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007; 27 (1): 6.
44. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988; 46 (2): 178.
45. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16 (2): 454.
46. Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation* 1988; 45 (4): 834.
47. Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 1989; 48 (3): 463.
48. Belló-Klein A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: *Estresse oxidativo e antioxidantes*, vol 1, ULBRA ed, Canoas, 2002: 15.
49. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988; 63 (4): 390.
50. Busquets J, Serrano T, Figueras J, et al. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc* 2002; 34 (1): 252.
51. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312 (3): 159.
52. Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O₂⁻ release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1991; 261 (4 Pt 1): G602.
53. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5 (4): 402.
54. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134 (3): 707.
55. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18 (8): 891.

56. 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 (3): 240.
57. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366 (1-2): 53.
58. Caraceni P, Ryu HS, van Thiel DH, Borle AB. Source of oxygen free radicals produced by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268 (3): 249.
59. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327 (6122): 524.
60. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003; 9 (1): 1.
61. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999; 30 (1): 1.
62. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998; 114 (2): 344.
63. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997; 100 (11): 2923.
64. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411 (2-3): 217.
65. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 2001; 276 (18): 14533.
66. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411 (2-3): 334.
67. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999; 43 (3): 509.
68. Kerwin JF, Jr., Lancaster JR, Jr., Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* 1995; 38 (22): 4343.
69. Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Rossi R. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta* 2003; 330 (1-2): 85.
70. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, *et al.* Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood. *Circ Res* 2002; 91 (6): 470.

71. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989; 65 (1): 1.
72. Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB, Ford PC. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol* 1996; 268: 12.
73. Mathews WR, Kerr SW. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267 (3): 1529.
74. Al-Sa'doni H, Ferro A. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98 (5): 507.
75. Al-Sa'doni HH, Khan IY, Poston L, Fisher I, Ferro A. A novel family of S-nitrosothiols: chemical synthesis and biological actions. *Nitric Oxide* 2000; 4 (6): 550.
76. Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 1997; 25 (3): 664.
77. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995; 4 (4): 282.
78. Langle F, Steininger R, Waldmann E, et al. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63 (9): 1225.
79. Liu P, Xu B, Hock CE, Nagele R, Sun FF, Wong PY. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. *Am J Physiol* 1998; 275 (6 Pt 2): H2191.
80. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998; 66 (5): 579.
81. Cottart CH, Do L, Blanc MC, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29 (3): 809.
82. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001; 34 (6): 1164.
83. Geller DA, Chia SH, Takahashi Y, Yagnik GP, Tsoulfas G, Murase N. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001; 25 (3): 142.

84. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27 (3): 755.
85. Langle F, Roth E, Steininger R, Winkler S, Muhlbacher F. Arginase release following liver reperfusion. Evidence of hemodynamic action of arginase infusions. *Transplantation* 1995; 59 (11): 1542.
86. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29 (1): 126.
87. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25 (4): 934.
88. Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, *et al.* Increased nitric oxide production in the liver in the perioperative period of partial hepatectomy with Pringle's maneuver. *J Hepatol* 1998; 28 (2): 212.
89. Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothioureia, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1998; 10 (1): 20.
90. Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 1999; 68 (6): 803.
91. Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995; 108 (2): 603.
92. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; 46 (4): 512.
93. Lange R, Erhard J, Rauen U, de Groot H, Eigler FW. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; 62 (9): 1255.
94. Álvares-da-Silva MR. A influência do dano de isquemia/reperfusão na função do enxerto e na evolução imediata em pacientes submetidos a transplante hepático- o papel da biópsia de reperfusão. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
95. Minor T, Yamaguchi T, 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 (3): 174.

96. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13 (1): 83.
97. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53 (5): 957.
98. Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78 (9): 1267.
99. Hertl M, Howard TK, Lowell JA, et al. Changes in liver core temperature during preservation and rewarming in human and porcine liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1996; 2 (2): 111.
100. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25 (5): 774.
101. Shibuya H, Ohkohchi 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 (1-2): 1328.
102. 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 (5): 1115.
103. Kahn D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomatic biliary strictures [correction of structures] ? *HPB Surg* 1996; 9 (2): 113.
104. Nardo B, Cavallari G, Catena F, *et al.* Comparison between University of Wisconsin and Celsior solution on morphology and viability of rat aorta after cold storage. *Transplant Proc* 2000; 32 (1): 35.
105. 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 (12): 1514.
106. Cheng Y, Liu YF, Cheng DH, Li BF, Zhao N. Evaluation of CMU-1 preservation solutions using an isolated perfused rat liver model. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (16): 2522.
107. Fraga RS. Comparação entre fructose -1,6-bisfosfato e solução da Universidade de Wisconsin na preservação de fígados de ratos: a proteção contra o dano precoce isquemia/reperfusão. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

108. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28 (2): 281.
109. Natori S, Selzner M, Valentino KL, *et al.* Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999; 68 (1): 89.
110. Southard J, Belzer F. Principles of organ preservation. In: Busuttil R, Klintmalm, BB, ed. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 379.
111. de Oliveira CP, Simplicio FI, de Lima VM, *et al.* Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (12): 1905.
112. de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, *et al.* Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol* 2006; 45 (5): 725.
113. Andraus W. Estudo do efeito da S-nitroso-N-acetilcisteína na lesão de isquemia/reperfusão em fígado esteatótico de ratos. *Clínica Cirúrgica*. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2007.
114. Ricardo KF, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* 2002; 7 (1): 57.
115. Pinto Krueel CR, Scherer de Fraga R, Dal Molin S, *et al.* Hepatic reperfusion in rats: a new model with portal arterialization in studying early ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007; 39 (10): 3015.
116. Halliwell B GJ. *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
117. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds. *Methods of enzymatic analysis*. Nova York, 1986: 273.
118. Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988; 175 (2): 408.
119. Ates Y, Mas MR, Mas N, *et al.* Acinar cell ultrastructure after taurine treatment in rat acute necrotizing pancreatitis. *Saudi Med J* 2006; 27 (4): 446.
120. Mas N, Isik AT, Mas MR, *et al.* Hyperbaric oxygen-induced changes in bacterial translocation and acinar ultrastructure in rat acute necrotizing pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40 (10): 980.

121. Mas N, Tasci I, Comert B, Ocal R, Mas MR. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14 (7): 1108.
122. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995; 1 (2): 124.
123. Ferrigno A, Tartaglia A, Di Nucci A, *et al.* Further studies on long-term preservation of rat liver: Celsior versus UW solution. *In Vivo* 2008; 22 (6): 681.
124. Ben Mosbah I, Rosello-Catafau J, Franco-Gou R, *et al.* Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transpl* 2006; 12 (8): 1215.
125. Ben Abdennebi H, Elrassi Z, Scoazec JY, Steghens JP, Ramella-Virieux S, Boillot O. Evaluation of IGL-1 preservation solution using an orthotopic liver transplantation model. *World J Gastroenterol* 2006; 12 (33): 5326.
126. Moresco RN, Santos RC, Alves Filho JC, *et al.* Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36 (5): 1261.
127. Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol. *Ann Transplant* 2004; 9 (2): 35.
128. Straatsburg IH, Abrahamse SL, Song SW, Hartman RJ, Van Gulik TM. Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after cold storage using UW, HTK, and Celsior. *Transplantation* 2002; 74 (4): 458.
129. Nunes FB, Simoes Pires MG, Alves Filho JC, Wachter PH, Rodrigues De Oliveira J. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose 1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; 30 (9): 2069.
130. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JC, *et al.* An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; 47 (1): 35.
131. Lausada NR, Gondolesi GE, Ortiz E, Dreizzen E, Raimondi JC. [Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2002; 32 (2): 63.
132. Cursio R, Colosetti P, Auberger P, Gugenheim J. Liver apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion: in vivo evaluation of caspase activity by FLIVO assay in rats. *Transplant Proc* 2008; 40 (6): 2038.
133. Saavedra-Lopes M, Ramalho FS, Ramalho LN, *et al.* The protective effect of CAPE on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2008; 150 (2): 271.

134. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, *et al.* Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford)* 2007; 9 (2): 112.
135. Ayoub T AK. Liver transplant anesthesia: an update. *Curr Opin Organ Transplant* 2003; 8: 252.
136. Waynforth H, Flecknell P. *Experimental and surgical technique in the rat*. Second ed. New York: Academic Press Hacount Brace Favanovich, 1992.
137. Garcia JA, dos Santos L, Moura AL, *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 51 (1): 78.
138. de Oliveira CP, de Lima VM, Simplicio FI, *et al.* Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *J Am Coll Nutr* 2008; 27 (2): 299.
139. Liu K, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. S-nitroso-N-acetylcysteine protects skeletal muscle against reperfusion injury. *Microsurgery* 1998; 18 (5): 299.
140. Barker JU, Qi WN, Cai Y, Urbaniak JR, Chen LE. Addition of nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylcysteine to selective iNOS inhibitor 1400W further improves contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2005; 25 (4): 338.
141. Chou CH, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Effect of a nitric oxide donor on microcirculation of acutely denervated skeletal muscle during reperfusion. *J Reconstr Microsurg* 2002; 18 (1): 53.
142. Davern T, Scharschmidt B. Biochemical liver tests. In: Feldman M, Friedman L, Sleisenger M, eds. *Gastrointestinal and Liver Disease*, vol 2. Philadelphia: Saunders, 2002: 1227.
143. Biasi F, Bosco M, Chiappino I, *et al.* Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Radic Biol Med* 1995; 19 (3): 311.
144. Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, *et al.* Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 2001; 72 (10): 1692.
145. Burke A, FitzGerald GA, Lucey MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74 (2): 217.
146. Grezzana TJ, Corso CO, Zanutelli ML, *et al.* Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36 (4): 843.

147. Bao YM, Adam R, Samuel D, Castaing D, Bismuth H. Influence of high aminotransferase levels on rejection in liver transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26 (1): 259.
148. Peralta C, Rull R, Rimola A, *et al.* Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; 71 (4): 529.
149. Mota SM, Gasperin G, Cerski CTS, Oliveira JRd, Álvares-da-Silva MR. Ageing and its impact on the quality of grafts: an experimental study in rat livers. *Archives of Gastroenterology* in press.
150. Dalgic A, Taneri F, Cindoruk M, Poyraz A, Akyol G. Effects of verapamil, sodium nitroprusside and glutathione addition into perfusion/preservation solutions on preservation-related ICAM-1 molecule expression in rat liver. *Turk J Gastroenterol* 2009; 20 (3): 180.

ANEXO 1- Artigo publicado do modelo de reperfusão utilizado



Hepatic Reperfusion in Rats: A New Model With Portal Arterialization in Studying Early Ischemia-Reperfusion Injury

C.R. Pinto Kruehl, R. Scherer de Fraga, S. Dal Molin, S.M. Mota, G. Gasperin, C.T.S. Cerski, J.R. de Oliveira, and M.R. Álvares-da-Silva

ABSTRACT

Isolated liver perfusion has been used to evaluate the beneficial effects of several agents. In the present study, we developed a model using a recipient rat to reperfuse harvested livers in an ex situ, in vivo recirculating system. A total of 25 reperfusion procedures using adult male Wistar rats as donors and recipients were done. The preservation of the livers was performed with University of Wisconsin solution for 6 hours. Thereafter, the liver was reperfused with blood from another rat. We believe that the model presented herein offers an alternative method to evaluate early hepatocellular damage or hepatic microcirculation.

THERE ARE FIVE commonly used methods to study hepatic metabolism: isolated hepatocytes, cell culture, liver slices, perfused or in vivo liver.¹ Models without a reperfusion system are easier to perform and control, but they do not reproduce the physiological scenario of liver reoxygenation.

Regarding the ischemia-reperfusion (I/R) process, one of the earliest and most important features related to tissue damage is the production of reactive oxygen species (ROS).² New therapeutic strategies might be focused on ROS-induced early lesions to decrease graft injury. Experimental models involving liver reperfusion are still an important tool in this process.

At present, isolated liver perfusion has been used to evaluate the beneficial effects of several agents. This model uses Krebs-Henseleit bicarbonate buffer with or without blood to simulate reperfusion in a closed circuit system with pumps. This reperfusion method simulates the in vivo environment with the advantage of precisely controlling experimental conditions.¹ However, it shows some limitations, such as the absence of whole blood components and hormones.

Liver transplantation in animals has also been used by many researchers to study hepatic damage after reperfusion stress. Although animal transplantation creates almost the same conditions faced in clinical practice, it is one of the most difficult models in experimental surgery.³ In the present study, we developed a model to study early I/R injury, through oxidative stress, using a recipient to reperfuse harvested livers in an ex situ and in vivo recirculating system, seeking to simulate a liver transplantation procedure.

MATERIALS AND METHODS

Adult male Wistar rats underwent 25 reperfusion procedures, including the same number of liver procurements. The first 10 were considered a pilot study to develop the model. At this no specimens were collected for biochemical or histological analysis.

Animals

Rats weighing 300 to 450 g were used as donors and recipients. The animals were housed at 22°C controlled temperature with light and dark cycles and fed rat chow and water ad libitum. All 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 (Ethical Committee of UEA/HCPA/UFRGS) and fulfilled all local regulations for research involving experimental animals.

From the Division of Gastroenterology, Post-Graduate Program in Gastroenterology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; and the Biophysical Laboratory, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

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

Address reprint requests to Raquel Scherer de Fraga, MD, Post-Graduate Program in Gastroenterology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul RS90035-003, Brazil. E-mail: rschfraga@terra.com.br

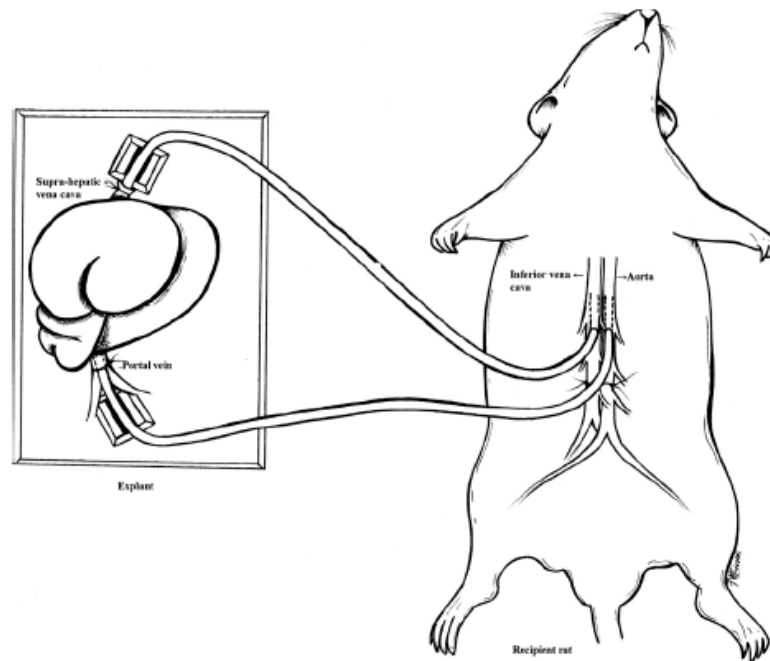


Fig 1. The reperfusion model.

Procedures

All procedures were performed on a warmed surgical table to keep the animal at a proper temperature. The animals were submitted to inhalation anesthesia with a calibrated vaporizer mixture of oxygen and isoflurane 1.5% (Isoflurano, Abbott) through a face mask. After shaving and disinfecting the abdominal wall with povidine iodine, it was opened by a midline incision with bilateral subcostal extensions.

The bile duct was cannulated with N22 (Abbocath), and 250 IU of heparin was injected through the infrahepatic vena cava. The infrarenal aorta was cannulated with an N4 catheter. The portal vein was also cannulated with an N6 catheter. After vascular cannulation, supradiaphragmatic aorta was cross-clamped to start retrograde perfusion. University of Wisconsin (UW) solution (Viaspan, Bristol-Myers-Squibb) at 4°C (125 mL) was infused through the portal vein and the aorta at a constant perfusion pressure of 60 cm H₂O. The suprahepatic vena cava was transected close to the diaphragm, allowing outflow of the perfusate. During perfusion, the abdominal cavity was cooled with normal saline ice. At the end of perfusion, livers harvested with a catheter inserted into the portal vein were placed into a plastic bag containing 80 mL of cold UW solution. The organs were stored at 4°C for 6 hours.

After cold storage, livers were taken to room temperature (22°C) to increase warm ischemia time. The superior vena cava was cannulated with an N6 tube and the inferior vena cava was closed with a 4.0 silk tie. The organs were flushed with 5 mL of normal saline (0.9%) to wash out UW solution. Another N4 catheter was connected to the portal vein catheter to avoid vessel-catheter diameter mismatch during aorta cannulation in the recipient rat. After a period of 15 minutes at room temperature, the liver was

placed on in a small table at the left side of the operating table. This table was 10 cm higher than the operating field, a difference adopted to facilitate venous outflow through the recipient rat.

At the same time, another rat was anesthetized with a mixture of oxygen and isoflurane (1.5%), and the abdomen incised caudocranially. The inferior vena cava and infrarenal aorta were encircled by a 4.0 silk, and tributaries ligated to increase vessel length for cannulation. Heparin (250 IU) was intravenously injected, and later, the distal portions of the inferior vena cava and aorta were ligated to exclude lower limb circulation. A clamp was placed just above left renal vein taking vena cava and aorta, which was cannulated using a 25-cm-long catheter connected to the portal vein of the excised liver. The inferior vena cava cannulated by an N6 catheter was also connected to the explant superior vena cava to create a closed circuit system (Fig 1).

Reperfusion was initiated by releasing the clamp. Fluid replacement with 3 to 5 mL of saline solution intravenously was performed to maintain the blood pressure. After 15 minutes of arterial reperfusion, the system was interrupted, and samples from the suprahepatic vena cava of the reperfused liver were taken for kinetic measurements of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH; a Liquiform kit). At this point, the animals were sacrificed by exsanguination, during anesthesia. The reperfused liver tissue was flushed with 10 mL of saline solution and liver fragments processed for histological examination.

Histological Analysis

Liver biopsies fixed in 10% buffered formalin were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin.

Statistics

Statistics were performed using SPSS 10.0 for Windows. The mean scores were calculated with results expressed as mean values \pm standard deviations.

RESULTS

During the first phase—the pilot study—the liver was kept under ex situ reperfusion for a longer period than possible until the death of the animal due to circulatory shock. Two rats died just after clamp release, and another three rats died between 7 and 10 minutes of reperfusion. Average reperfusion time was 14.9 (± 11.9) min, so that 15 minutes was used for the second phase of the study. However, it was remarkable that with increasing experience, it was also possible to increase the reperfusion time. Considering just the last five experiments, the average reperfusion time was 22.9 (± 11.2) min (Table 1).

In the second phase, there were no animal losses during the reperfusion. Body weight was 400.4 (± 39.5) g. Average serum levels of AST, ALT, and LDH were 162.2 (± 128.3) UI/L, 150.6 (± 102.2) UI/L, and 1161.6 (± 1053.9) UI/L, respectively. Warm ischemia time was 56.6 (± 10) minutes.

In 60% of the livers, slight hepatocyte vacuolization ($n = 9$) was seen, and macrovesicular steatosis was seen in 40%. Sinusoidal congestion and signs of preservation injury were not detected (Fig 2).

DISCUSSION

Experimental models play an important role to develop new strategies. Both early and late effects of reperfusion can be evaluated in transplanted animals,^{4,5} especially larger animals such as pigs, but they are time-consuming and expensive. 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, but requires thorough training.

We developed an original model of liver reperfusion in rats. First, this model involved cold storage, warm ischemia, and reperfusion, simulating a liver transplantation. Therefore, it was distinct from other I/R models, which usually are made with just normothermic reperfusion.

Table 1. Reperfusion Time Obtained in the Pilot Study Experiments

Procedures in Sequence of Events	Reperfusion Time (min)
1	1.5
2	1.8
3	14.5
4	7.3
5	9.1
6	8.2
7	13.5
8	31
9	30
10	32

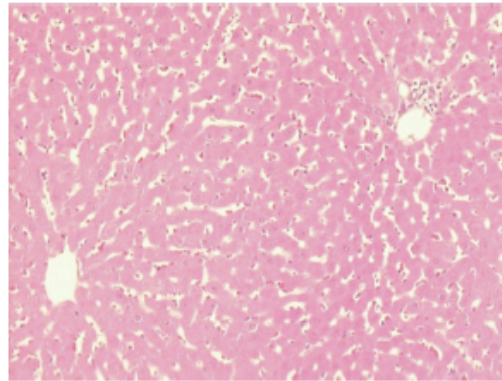


Fig 2. Normal hepatic architecture, without signs of preservation injury (hematoxylin-eosin, 200 \times).

Portal blood is important for the liver, and in liver transplantation the portal vein is the usual way to reperfuse the organ. Our initial idea was to use the portal vein flow to reperfuse the liver graft. Using this technique, venous outflow was insufficient to maintain liver blood supply. Then, we decided to arterialize portal vein flow. This technique has been used in rat transplant models without prejudice to the graft.^{6,7} One may consider that arterial flow could damage the hepatic microcirculation. As I/R injury is directly related to oxidative stress, reperfusion with more oxygenated arterial blood could increase the lesion.

Most published studies have evaluated hepatocellular injury after 30 minutes of the reperfusion.^{8–10} Despite the limited observation time of our study, recent publications have demonstrated that early markers could estimate graft damage in an early phase of reperfusion¹¹ or even in the washout solution after hepatic rinsing.¹²

Due to the short time of the reperfusion, it was not expected to find classic histological changes of ischemic injury, preventing the use of international standards to describe the pathological findings of liver ischemia. In the present study, liver histology showed adequate organ viability without signs of endothelial damage or of preservation injury.

Our group is using this model of reperfusion in comparative studies with different preservation solution for measurement of hepatic enzymes, as well as evaluation of oxidative stress, of cytokine formation, and of intercellular adhesion molecule expression.

Considering the results, we believe that the model presented herein is an alternative to evaluate early hepatocellular damage and microcirculation.

REFERENCES

1. Brouwer KL, Thurman RG: *Pharmaceutical Biotechnology* 8:161, 1996
2. Fondevila C, Busutil RW, Kupiec-Weglinski JW: *Exp Mol Pathol* 74:86, 2003

3. Holzen JP, Palmes D, Langer M, et al: *Microsurgery* 25:614, 2005
4. Mueller THJ, Kienle K, Beham A, et al: *Transplantation* 78:1267, 2004
5. Müller V, Brummer D, Erhardt W, et al: *Transpl Int* 17:822, 2005
6. Schleimer K, Stippel DL, Kasper HU, et al: *J Surg Res* 116:202, 2004
7. Müller V, Brummer D, Kissler H, et al: *Transplantation* 78:1159, 2004
8. Nagel S, Hegemann O, Groneberg DA, et al: *Toxicol Pathol* 33:434, 2005
9. Nowak G, Norén UG, Wemerson A, et al: *Transpl Int* 17:804, 2005
10. Amault I, Bao YM, Sebah M, et al: *Transplantation* 76:77, 2003
11. Monbaliu D, de Vries B, Crabbé T, et al: *Transplan Proc* 37:413, 2005
12. Smrekova R, Vajdova K, Kukan M, et al: *Transplantation* 70:430, 2000

ANEXO 2- Datos Brutos

DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS UTILIZADAS

pesodoa= peso do rato doador, em gramas

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

tcirdoa= tempo de cirurgia do doador, em minutos

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

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

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

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

reperf= tempo de reperfusão, em minutos

pesorec= peso do rato receptor, em gramas

pesofig= peso do fígado após reperfusão, em gramas

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

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

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

solução= solução de preservação utilizada, conforme especificado:

2= UW

7= SNAC

11= SNAC+UW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 3- Artigo para publicação

S-nitroso-N-acetylcysteine on early ischemia/reperfusion injury in rat liver: it is a promising drug

Raquel Scherer de Fraga¹, Vera Regina Camacho¹, Gabriela F Souza², Carlos Thadeu Schmidt Cerski¹, Jarbas Rodrigues de Oliveira⁴, Marcelo Ganzarolli de Oliveira², Mário Reis Álvares-da-Silva¹

Department and Institution

The ¹ School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; ² Institute of Chemistry, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ³ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Biophysical Laboratory, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Mário Reis Álvares-da-Silva, MD, PhD

Address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Division of Gastroenterology- Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre RS90035-003, Brazil.

Phone: +55 51 33598307 Fax: +55 51 33598001

E-mail: mras@terra.com.br

Short title: SNAC on ischemia/reperfusion

Financial Support

This project was partly supported 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. GFPS held a studentship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, project 07/558773.

ABSTRACT

Background/aims: Ischemia-reperfusion injury is one of the major causes of poor graft function early after liver transplantation which adversely influences patients' survival. A variety of mediators have been implicated in the pathogenesis of ischemia-reperfusion vascular injury, including nitric oxide (NO). Due to the beneficial effects of NO during preconditioning and reperfusion, strategies to prevent or ameliorate ischemia-reperfusion injury through the stimulation of hepatic NO production are an area of significant clinical interest. We evaluated the role of SNAC (*S-nitroso-N-acetylcysteine*) as an NO donor, in the prevention of liver ischemia-reperfusion injury in an animal model.

Methods: Adult male Wistar rats were randomly assigned into three experimental groups of 5 animals/group: 1. University of Wisconsin (UW) solution group; 2. SNAC solution group; and 3. SNAC-containing UW solution (SNAC+UW) group. AST, ALT and LDH were determined on samples of the cold storage solution at 2, 4 and 6 h of preservation. After 6 h of cold storage, an 15 min reperfusion model was applied. After this period, the reperfusion system was interrupted and blood samples were taken for measurements of AST, ALT, LDH and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Hepatic fragments were processed for histological studies, determination of TBARS, catalase and glutathione, and also expression ICAM-1 and TNF-R2.

Results: During the cold preservation, AST and LDH in the SNAC group were significantly lower than in UW group and the SNAC+UW group ($p=0.004$ and $p=0.03$, respectively). ALT was comparable among the groups ($p=0.3$).

After reperfusion, serum levels of AST, ALT and LDH, as well as hepatic TBARS and catalase showed no significant differences among the groups different among the groups. Compared to the UW group glutathione concentration was lower in the SNAC and

SNAC+UW ($p < 0.001$). No histological signs of preservation injury were found. In immunohistochemistry, the expression of ICAM-1 and TNF-R2 were not detected in any of the organs.

Conclusion: SNAC solution showed a higher protective effect for the preservation of rat livers during cold storage, but was comparable to UW solution post-reperfusion.

Keywords: S-nitroso-N-acetylcysteine, nitric oxide, liver, ischemia-reperfusion injury

INTRODUCTION

Orthotopic liver transplantation (OLT) has been the standard treatment of end-stage liver disease ⁽¹⁾. Its outcomes depend on many factors, including organ donor condition, surgical technique, recipient clinical status and organ preservation. While the first three factors have been extensively studied and reached a state-of-the art condition ⁽²⁾, liver preservation still have margin for improvement.

The University of Wisconsin (UW) solution has been widely employed in OLT, mainly due to its preventive effect on oxidative stress and preservation of cellular metabolism during ischemia ⁽³⁾. However, such solution can fail in the process of endothelial protection ⁽⁴⁾. The employment of solutions with optimized profile in the preservation of the liver might ameliorate transplant outcomes.

Ischemia-reperfusion (IR) injury is one of the major causes of poor graft function early after OLT and adversely influences patients survival after transplantation ⁽⁵⁾. A variety of mediators have been implicated in the pathogenesis of IR vascular injury, including nitric oxide (NO), which modulates flow and cell adhesion within the vasculature, as well as parenchymal cell redox status. Manipulation of NO bioactivity through inhibition and induction in experimental models of IR injury supports a role for NO in IR injury ⁽⁶⁻¹²⁾.

As NO has beneficial effects during preconditioning and reperfusion, strategies to prevent or ameliorate IR injury through the stimulation of hepatic NO production are an area of significant clinical interest. Intervention seems more warranted early in the process, during organ procurement, storage, or reperfusion, before the onset of IR injury, when support of microcirculatory function might be most beneficial ⁽⁶⁾.

S-nitrosothiols (RSNOs) have been recognized as novel NO donor drugs. Some of these compounds occur naturally in vivo, such as S-nitroalbumin, S-nitroso-L-cysteine, and S-nitroglutathione (GSNO), and others have been synthesized chemically like S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) ⁽¹³⁾.

The aim of this study was to evaluate the role of SNAC in the prevention of liver IR injury in an animal model in comparison to the standard UW solution.

Animals (subjects)

Adult male Wistar rats (n = 15) weighting 350-400 g were allocated in 3 groups of 5 animals accordingly to the preservation solution: UW solution, SNAC solution, and SNAC-containing UW solution (SNAC+UW). The study was performed in accordance with the “Guide for the care and use of laboratory animals” and approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Preservations solutions

The UW solution used was Viaspan, ® Bristol-Myers-Squibb. SNAC solution was synthesized through the S-nitrosation of N-acetyl-L-cysteine (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) in an acidified sodium nitrite solution ⁽¹⁴⁾. SNAC solution (0.1 mol/L) was diluted in saline to 200 nmol/L before administration. In the SNAC + UW group, stock SNAC solution was diluted in UW solution to 200 nmol/L.

Experimental Design

The animals were manipulated according to our previously study ⁽¹⁵⁾. Briefly, animals were anesthetized with inhalatory isoflurane 1.5% and underwent liver removal. The

organs were kept in preservation solutions for 6 h, followed by warm ischemia, and reperfusion during 15min.

Biochemical Measurements

Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in cold preservation (at 2, 4 and 6 hours) and in blood drawn from the heart. Enzyme activity measurements were performed in Roche/Hitachi analyzer, using reagents from Roche Diagnostics according to standard methods.

Measurements of hepatic TBARS, catalase and glutathione

To the measurement of TBARS, the hepatic fragment was warmed with thiobarbituric acid 0.67% and trichloroacetic acid 10% during 15 min, being the sample afterwards refrigerated and centrifugated. The ruddy product was quantified by spectrophotometry in 535nm.

Catalase activity was assayed according to Aebi (1983) by measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0,1% triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 10 ul supernatants. The activity of enzyme was expressed as micromoles of H₂O₂ consumed per minute per milligram protein ⁽¹⁶⁾.

Reduced glutathione in the hepatic tissue was evaluated by the DTNB method ⁽¹⁷⁾.

Histological analysis

Liver tissue slices (approximately 7g) were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin. The parameters analyzed were steatosis, hepatocyte vacuolization, neutrophilia and sinusoidal congestion. All samples were evaluated by 2 blinded pathologists.

Immunohistochemistry

The expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptors (TNF-R2) in the liver tissue after reperfusion was determined by immunohistochemistry. Two observers independently assessed the immunohistochemical reactions; where the findings were divergent, an agreement was reached after discussion. A semi-quantitative scale was used to standardize the immunohistochemical evaluation for the subsequent statistical analysis. Expression ratio of ICAM-1 and TNF-R2 was scored from 0 to 2: 0, no expression; 1, focal expression; 2, diffuse expression.

Statistics

Statistics were performed with SPSS 15.0 for Windows. Data were presented as mean \pm SD, or except otherwise stated. Quantitative variables were first analyzed concerning Gaussian distribution and assessed with ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis test (non-parametric). Categorical variables were analyzed using Fisher exact test. Differences were considered statistically significant when p was less than 0.05.

RESULTS

During the cold preservation, AST and LDH release in the SNAC group were significantly lower than in the UW group and SNAC+UW group ($p= 0.004$ and $p=0.03$, respectively). ALT release was comparable between the groups ($p=0.053$). (Figure 1)

After reperfusion, serum levels hepatic enzymes (AST, ALT and LDH), TBARS and catalase were not significantly different among the groups. Compared to the UW group reduced glutathione concentrations were lower in the SNAC and SNAC+UW ($p=0.006$ and $p=0.01$, respectively). (Table 1)

Mild hepatocyte ballooning and focal sinusoidal congestion were observed in all livers. Steatosis in less than 30% of the hepatocytes was found in the UW group ($n=2$) and in the SNAC+UW group ($n=1$). Focal necrosis was only detected in the livers preserved with SNAC solution ($n=2$). No sign of preservation injury were found in any of the organs.

In immunohistochemistry, the expression of ICAM-1 and TNF-R2 was not detected in any of the organs.

DISCUSSION

IR injury of the liver remains one of the major problems in extended hepatic resection and OLT. Several mechanisms of the reperfusion injury have been postulated, such as oxygen-derived free radicals ⁽¹⁸⁾ and disturbance of microcirculation ⁽¹⁹⁻²¹⁾. NO has controversial effects on IR injury, although it can improve the hepatic microcirculatory status in low concentrations ⁽²²⁾. SNAC is a drug donor of NO ⁽²³⁻²⁴⁾, which might be useful in reducing the hepatic damage in a IR scenario. Previous studies have already demonstrated benefits of SNAC in experimental models of skeletal muscle IR ⁽²⁵⁻²⁹⁾ and in livers with steatohepatitis ⁽²⁴⁾. We compared the role of SNAC as preservation solution of livers in a murine model of IR with the standard solution (UW), using biochemical and histological parameters, besides the variables related to oxidative stress.

The main findings of this study were: (i) during cold preservation, SNAC solution presented a higher capacity to keep hepatocyte integrity, as demonstrated by a lower level of hepatic enzymes on preservation liquid; (ii) after the reperfusion, there were no differences among the solutions when analyzing hepatocellular injury and the markers of IR injury (ROS; ICAM-1 and TNF-R2 expression); (iii) histological findings of injury preservation weren't detected in any of the samples.

The release of hepatic enzymes in the preservation solution can be considered an important index to evaluate the quality of the organ preservation ⁽³⁰⁾, being a marker for preexisting damage or for damage acquired during cold ischemia ⁽³¹⁾. In this study, we found a lower level of AST and LDH in the samples of the preservation liquid containing SNAC, with a tendency for lower ALT levels in this group. This result suggests a better preservation by SNAC solution. Considering that SNAC has really preserved better the organs during cold ischemia, we can assume some mechanisms that have contributed for

this fact. SNAC have been recognized as a NO drug donor ⁽¹³⁻¹⁴⁾. The effect of NO in the IR scenario seems to be more related to the modulation of blood flow and cell adhesion within the vasculature than the direct protection of the parenchyma cells ^(7,10,12,32). This leads us to think that its action occurs mainly after the reperfusion. However, the results of this study do not permit us to elucidate the mechanisms through which the SNAC could have carried on hepatocellular protection during the cold preservation.

The UW solution (standard solution in the hepatic transplant ⁽³³⁾, SNAC and the SNAC + UW demonstrated comparable results in the initial moments of the reperfusion in the current study. These findings favor the idea that SNAC performed a role at least in liver preservation, but it did not show superiority in relation to the standard UW solution. The levels of glutathione were higher in the UW solution group, which is not a surprise, since this is one of its components ⁽³⁴⁾. On the other hand, the other two groups had a tendency to induce more the catalase activity.

There were no histological indications of preservation injuries in the samples studied, what was expected, since such alterations are usually evident 60-90 min after the reperfusion ⁽²¹⁾. Yet, the anatomopathological analysis is necessary to ascertain the homogeneity of the hepatic samples studied and to evaluate the good quality of the organ perfusion. In this study, the 3 groups had similar histological findings, with light sinusoidal congestion, what documents the good intra hepatic blood flow during the reperfusion process. ICAM-1 and TNF-R2 expressions weren't significant in all samples. Certainly, this occurred because we evaluated only the initial 15 min of the reperfusion, and the action of cytokines and adhesion molecules seem to initiate 2 h after of the blood flow restoration in an ischemic organ ⁽²¹⁾.

In conclusion, SNAC provided an improved cold preservation of rat livers relative to the UW solution, and might be an option for improving the quality of hepatic graft for transplantation. Further studies over longer reperfusion periods are necessary for understanding the possible mechanisms involved in the protective action of SNAC in IR injury.

REFERENCES

1. Wiesner RH. Current indication, contraindications and timing for liver transplantation. In: Company WS, ed. Transplantation of the liver. Philadelphia: Busuttil RW, Klintmalm GB, 1996.
2. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; 74 (6): 779.
3. Kahn D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomatic biliary strictures [correction of structures] ? *HPB Surg* 1996; 9 (2): 113.
4. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28 (2): 281.
5. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995; 1 (2): 124.
6. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998; 66 (5): 579.
7. Peralta C, Rull R, Rimola A, et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; 71 (4): 529.
8. Geller DA, Chia SH, Takahashi Y, Yagnik GP, Tsoulfas G, Murase N. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001; 25 (3): 142.
9. Langle F, Steininger R, Waldmann E, et al. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63 (9): 1225.
10. Liu P, Xu B, Hock CE, Nagele R, Sun FF, Wong PY. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. *Am J Physiol* 1998; 275 (6 Pt 2): H2191.
11. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995; 4 (4): 282.

12. Cottart CH, Do L, Blanc MC, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29 (3): 809.
13. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218 (3): 739.
14. Ricardo KF, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* 2002; 7 (1): 57.
15. Pinto Krueh CR, Scherer de Fraga R, Dal Molin S, et al. Hepatic reperfusion in rats: a new model with portal arterialization in studying early ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007; 39 (10): 3015.
16. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M, eds. *Methods of enzymatic analysis*. Nova York, 1986: 273.
17. Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988; 175 (2): 408.
18. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312 (3): 159.
19. Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE. Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Am J Physiol* 1985; 248 (6 Pt 2): H804.
20. Chazouilleres O, Ballet F, Chretien Y, et al. Protective effect of vasodilators on liver function after long hypothermic preservation: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989; 9 (6): 824.
21. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18 (8): 891.
22. Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995; 108 (2): 603.
23. Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Rossi R. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta* 2003; 330 (1-2): 85.

24. de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM, et al. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol* 2006; 45 (5): 725.
25. Park JW, Qi WN, Cai Y, Nunley JA, Urbaniak JR, Chen LE. The effects of exogenous nitric oxide donor on motor functional recovery of reperfused peripheral nerve. *J Hand Surg Am* 2005; 30 (3): 519.
26. Barker JU, Qi WN, Cai Y, Urbaniak JR, Chen LE. Addition of nitric oxide donor S-nitroso-N-acetylcysteine to selective iNOS inhibitor 1400W further improves contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2005; 25 (4): 338.
27. Chou CH, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Effect of a nitric oxide donor on microcirculation of acutely denervated skeletal muscle during reperfusion. *J Reconstr Microsurg* 2002; 18 (1): 53.
28. Liu K, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. S-nitroso-N-acetylcysteine protects skeletal muscle against reperfusion injury. *Microsurgery* 1998; 18 (5): 299.
29. Chen LE, Seaber AV, Nasser RM, Stamler JS, Urbaniak JR. Effects of S-nitroso-N-acetylcysteine on contractile function of reperfused skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 274 (3 Pt 2): R822.
30. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; 46 (4): 512.
31. Lange R, Erhard J, Rauen U, de Groot H, Eigler FW. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; 62 (9): 1255.
32. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003; 9 (1): 1.
33. Spiegel HU, Schleimer K, Freise H, Diller R, Drews G, Kranz D. Organ preservation with EC, HTK, and UW, solution in orthotopic rat liver transplantation. Part II. Morphological study. *J Invest Surg* 1999; 12 (4): 195.
34. Southard J, Belzer F. Principles of organ preservation. In: Busuttil R, Klintmalm, BB, ed. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: 379.

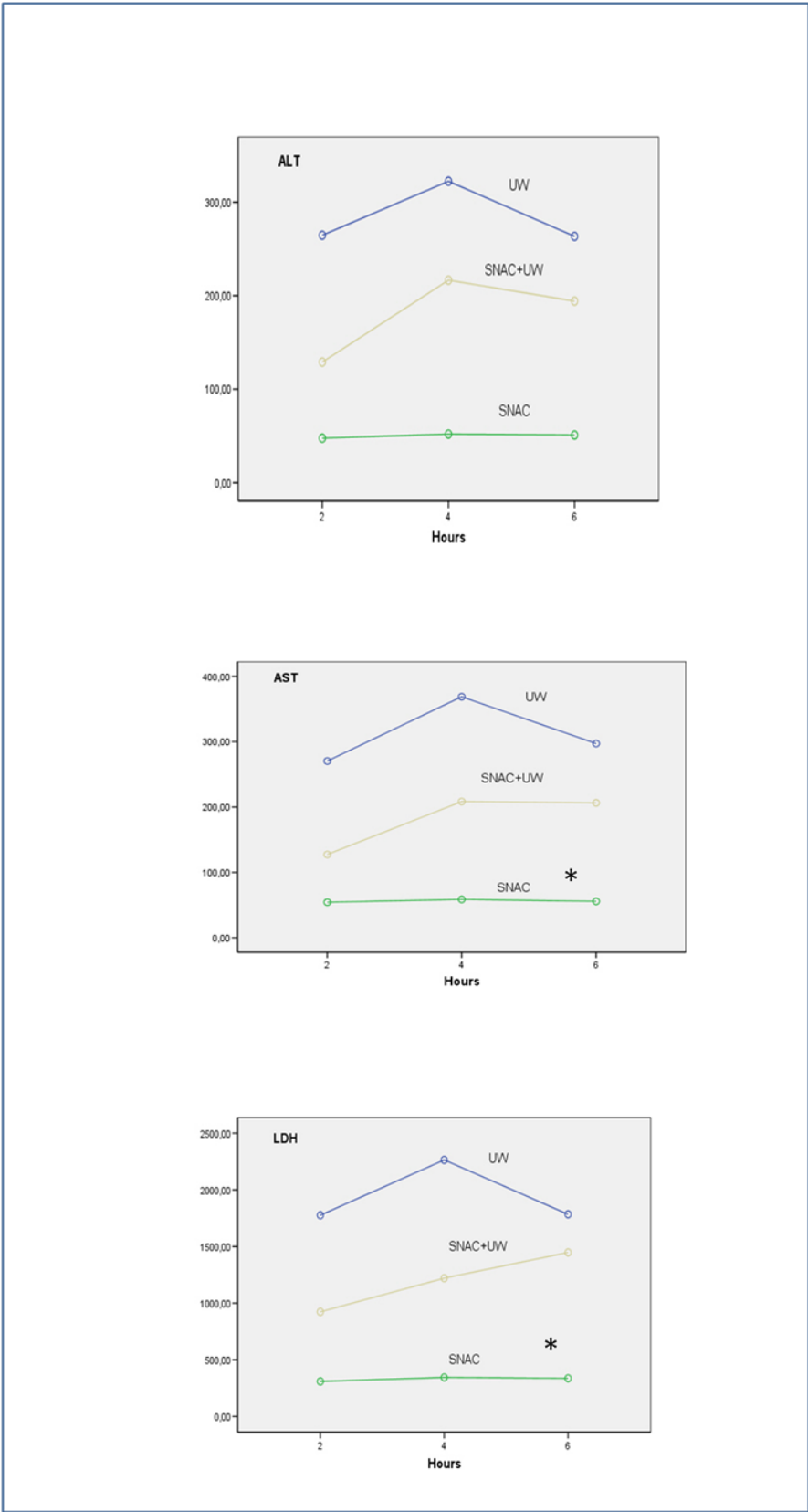


Figure 1. AST, ALT and LDH release into the preservation solution obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW, SNAC or UW+SNAC cold storage solutions. ANOVA. The significant difference was admitted with $p < 0.05^*$.

Table 1. Measurements post-reperfusion.

	UW	SNAC	SNAC+UW	<i>p</i>
ALT (UI/L)	742 (± 296)	962 (± 611)	1003 (± 1161)	0.7
AST (UI/L)	959 (± 466)	1153 (± 694)	823 (± 644)	0.8
LDH (UI/L)	6251 (± 2276)	7549 (± 2921)	7360 (± 6119)	0.9
TBARS (nmol/L/g liver)	45.2 (± 14.3)	52.2 (± 13.5)	47.6 (± 25.1)	0.8
Catalase (U/min/mg)	80.4 (± 14.7)	102.3 (± 69.5)	181.8 (± 71.4)	0.07
Glutathione (nmol/L/g liver)	6841 * (4291-15645)	680 (250-1075.5)	2047 (806.5-2299.5)	< 0.001

Values of glutathione were expressed as median (interquartile range) -Kruskal-Wallis test. Other variables were expressed as mean ± SD (ANOVA). The significant difference was admitted with $p < 0.05^*$.