



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Marco Antonio Corrêa Guimarães Filho

**Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em modelo de  
lesão hepática por isquemia-reperfusão em ratos**

Rio de Janeiro

2013

Marco Antonio Corrêa Guimarães Filho

**Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em modelo de lesão hepática  
por isquemia-reperfusão em ratos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador Prof. Dr. Marcos Bettini Pitombo

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G963 Guimarães Filho, Marco Antonio Corrêa.

Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em modelo de lesão hepática por isquemia-reperusão em ratos / Marco Antonio Corrêa Guimarães Filho. – 2013.  
59 f.

Orientador: Marcos Bettini Pitombo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Precondicionamento Isquêmico - Métodos. 2. Fígado - Irrigação sanguínea. 3. Isquemia - Teses. 4. Traumatismo por reperusão. 5. Citocinas - Teses. I. Pitombo, Marcos Bettini. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616-006.4:616.36

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Marco Antonio Corrêa Guimarães Filho

**Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em modelo de lesão hepática  
por isquemia-reperfusão em ratos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de novembro de 2013.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Betinni Pitombo  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ruy Garcia Marques  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo Haruo Saito  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wellington Andraus  
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Ao meu avô, Antonio Carvalho de Freitas (*in memoriam*), como reconhecimento do exemplo de profissional e todo apoio e estímulo que me ofereceu durante toda minha carreira acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

Um trabalho como este não seria possível sem a contribuição de várias pessoas, e a elas meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Bettini Pitombo, por acreditar neste projeto e pelo incentivo, orientação e auxílio na sua execução.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Érika Cortez e Prof.<sup>a</sup> Dra. Laís de Carvalho, do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo auxílio inestimável na execução do estudo histopatológico.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade do Estado de Rio de Janeiro, pela orientação e colaboração no estudo das citocinas.

Ao Dr. Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, médico-veterinário, e ao Sr. Domingos Henrique Souza Peçanha, bioterista, ambos do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo auxílio na realização dos procedimentos cirúrgicos e, acima de tudo, pela amizade e apoio durante todas as fases de execução deste estudo.

À Prof.<sup>a</sup> Ângela Cristina Gouvêa, do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense, pela orientação inicial sobre o estudo histopatológico, parte fundamental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ruy Garcia Marques, exemplo de professor e pesquisador, que serviu de estímulo inicial para minha a carreira acadêmica que ora se inicia.

Aos Drs. Orlando Hiroshi Kiono Siqueira e João Alves Bezerra Neto, do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense, e à Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina Araújo Maya, do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, colegas de trabalho, pelo estímulo, apoio e compreensão ao longo dos dois anos de elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, Marco Antonio Corrêa Guimarães e Mariza Freitas Corrêa Guimarães, por acreditar neste projeto e o apoio e carinho irrestritos oferecidos durante sua execução.

À minha mulher, Ana Maria Studart Corrêa Guimarães, e meus filhos, pela compreensão das horas roubadas ao seu convívio na elaboração deste trabalho.

## RESUMO

GUIMARÃES FILHO, Marco Antonio. *Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em modelo de lesão hepática por isquemia-reperfusão em ratos*. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A lesão por isquemia-reperfusão (I/R) é o mecanismo fisiopatológico central no desenvolvimento da insuficiência hepática pós-operatória. Diversas estratégias para minimizar suas consequências estão sendo desenvolvidas, mas ainda sem resultados satisfatórios. Recentemente o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR), método em que ciclos breves de I/R aplicados em um órgão ou membro é capaz de atenuar os resultados da I/R em um órgão distante, vem sendo utilizado, em modelos experimentais, com resultados promissores. No entanto seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido. Um dos mecanismos propostos é a modulação na expressão das citocinas sintetizadas durante a resposta inflamatória que acompanha o processo de I/R. Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, com peso entre 250 e 280 g, divididos em três grupos: Grupo Sham, cirurgia simulada; Grupo IR, isquemia de 70% do fígado por 45 minutos e reperfusão; e Grupo PCIR, pré-condicionamento isquêmico remoto do fígado através de seis ciclos de isquemia-reperfusão da pata do animal, com quatro minutos de isquemia e quatro minutos de reperfusão em cada ciclo, seguido de isquemia hepática semelhante ao do Grupo IR. Terminado os procedimentos cirúrgicos, metade dos animais foi morta decorridos 60 minutos de reperfusão, e a outra metade após 180 minutos. Foi coletado tecido hepático do lobo submetido à isquemia, para estudo histopatológico, utilizando o índice de injúria hepática modificado; e sangue, para dosagem plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e ALT. A análise histopatológica mostrou que a necrose celular foi significativamente reduzida no Grupo PCIR quando comparado com Grupo IR ( $p < 0,0001$ ). As transaminases mostraram o mesmo padrão com redução significativa dos seus valores no Grupo PCIR quando comparados com o Grupo I-R ( $p < 0,0001$ ). A dosagem das interleucinas mostrou redução significativa na expressão da IL-6 no Grupo PCIR quando comparado com o Grupo IR ( $p < 0,001$ ). Houve aumento da expressão de IL-10 nos grupo PCIR, porém não atingiu significância estatística. Não foi identificada diferença na dosagem de TNF- $\alpha$  nos grupos estudados. O PCI-R foi eficaz na redução na necrose celular resultante da lesão por I-R nos grupos estudados. A redução na síntese de IL-6 segue o padrão observado em outros estudos.

Palavras-chave: Isquemia-reperfusão. Pré-condicionamento isquêmico remoto. Citocinas.

## ABSTRACT

GUIMARÃES FILHO, Marco Antonio. *Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em modelo de lesão hepática por isquemia-reperfusão em ratos*. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Ischemia/Reperfusion (I/R) injury is an important pathophysiological mechanism in the postoperative liver failure. Different strategies to minimize the I/R liver injury have been developed during the last decades but the results had been disappointing. Recently, the remote ischemic preconditioning (RIPC), a method that involves a brief ischemic episode on an organ or tissue that subsequently affords protection to a remote organ or tissue, have been use in various experimental models with promising results. The precise pathway activated by the RIPC isn't clear, but cytokine release modulation has been proposed as a candidate mechanism. Thirty-six male rats (*Rattus norvegicus*) were divided in 3 groups: Sham; I/R injury, a 45 minutes lobar (70%) liver ischemia and reperfusion; and RIPC, 6 cycles of 4 minutes of ischemia and 4 minutes of reperfusion of the right hindlimb followed by a 45 minutes lobar (70%) liver ischemia and reperfusion. Liver tissue in the affected lobe and blood samples were collected after 60 minutes and 180 minutes of reperfusion for histopathological study of liver I/R, plasma cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10) and liver aminotransferases measurement (ALT). The histopathological study demonstrated a significant lesser degree of liver necrosis in the RIPC group ( $p < 0,001$ ). The aminotransferases levels followed the same pattern, with significant lower levels in the RIPC group ( $p < 0,001$ ). The cytokines assessment showed a reduction in the expression of IL-6 in the RIPC when compared with the I/R group ( $p < 0,01$ ). Interleukin-10 levels were higher in the RIPC group, but the difference wasn't significant. The TNF- $\alpha$  measurement didn't show any difference in the groups. The RIPC model presented consistently reduced the I/R injury to the liver and the IL-6 expression was similar to the reported in other studies.

Keywords: Ischemia-Reperfusion Injury. Liver. Remote ischemic preconditioning.

Tumor Necrosis Factor alpha. Interleukin-6. Interleukin-10.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ativação da CK.....	17
Figura 2 - Via de sinalização do TNFR1.....	19
Figura 3 - Procedimento cirúrgico do Grupo Sham.....	23
Figura 4 – Clampeamento do pedículo portal .....	24
Figura 5 – Clampeamento do pedículo vascular da pata inferior direita.....	24
Figura 6 – Fotomicrografias de tecido hepático .....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Avaliação da presença de necrose hepatocitária após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	31
Gráfico 2 – Avaliação da presença de balonização hepatocitária após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	33
Gráfico 3 – Avaliação da presença de infiltração de polimorfonucleares após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	34
Gráfico 4 – Avaliação da presença de vacuolização citoplasmática após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	35
Gráfico 5 – Avaliação da presença de eosinofilia hepatocitária após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	36
Gráfico 6 – Avaliação da presença de hepatócitos dissociados após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	37
Gráfico 7 – Avaliação da presença de extravasamento de hemácias após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	38
Gráfico 8 – Dosagem de AST após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão....	39
Gráfico 9 – Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) plasmáticas após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

I/R	Isquemia-reperfusão
CK	Células de Kupffer
ATP	Adenosina trifosfato
CES	Células endoteliais sinusoidais
NO	Óxido nítrico
HMGB1	<i>High-mobility group protein B1</i>
HSP	<i>Heat-shock protein</i>
DAMP	<i>Damage- associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
IRF	Fatores reguladores do interferon
CXCL-10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
IL	Interleucina
IFN	Interferon
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T cell</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
DD	<i>Death domain</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>
RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
CT-1	Cardiotrofina-1
LIF	Fator inibidor de leukemia
OSM	Oncostatina M
gp130	Glicoproteína 130
Jak	<i>Janus kinase</i>

Tyk2	Tirosina cinase 2
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
PoCI	Pós-condicionamento isquêmico
PCIR	Pré-condicionamento isquêmico remoto
Akt	<i>Protein Kinase B</i>
Erk	<i>Extracellular regulated kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
ALT	Alanina aminotransferase
LCE	Laboratorio de Cirurgia Experimental
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
α	Alfa
mL	Mililitro
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2	<b>MÉTODO</b> .....	22
2.1	<b>Animais e grupos</b> .....	22
2.1.1	<u>Grupo Sham</u> .....	23
2.1.2	<u>Grupo IR</u> .....	23
2.1.3	<u>Grupo PCIR</u> .....	24
2.2	<b>Delineamento temporal do experimento</b> .....	25
2.3	<b>Processamento do material</b> .....	25
2.3.1	<u>Separação do plasma</u> .....	25
2.3.2	<u>Processamento histológico</u> .....	25
2.4	<b>Dosagem das citocinas</b> .....	26
2.5	<b>Transaminases hepáticas</b> .....	27
2.6	<b>Estudo histopatológico</b> .....	27
2.7	<b>Análise estatística</b> .....	29
2.8	<b>Aspectos éticos nos cuidados com animais</b> .....	30
3	<b>RESULTADOS</b> .....	31
3.1	<b>Análise histopatológica</b> .....	31
3.1.1	<u>Necrose hepatocitária</u> .....	31
3.1.2	<u>Balonização hepatocitária</u> .....	33
3.1.3	<u>Infiltrado de polimorfonucleares</u> .....	34
3.1.4	<u>Vacuolização citoplasmática</u> .....	35
3.1.5	<u>Eosinofilia Citoplasmática</u> .....	36
3.1.6	<u>Dissociação hepatocitária</u> .....	37
3.1.7	<u>Extravasamento de hemácias</u> .....	38
3.2	<b>Transaminases</b> .....	39
3.3	<b>Dosagem das citocinas plasmáticas</b> .....	40
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

<b>ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ.....</b>	<b>59</b>
---	-----------

## INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas houve um aumento exponencial no número de cirurgias hepáticas. Este aumento deve-se a uma conjunção de fatores: aprimoramentos técnicos e tecnológicos que tornaram os procedimentos mais seguros; evolução do paradigma de tratamento das metástases colorretais, com a mudança do foco das metástases para o remanescente hepático; aumento na realização de transplantes hepáticos, resultado do uso de doadores de critério estendido e transplante intervivos; e uso de técnicas ablativas e da embolização portal.

Juntamente com o aumento no número de procedimentos, houve significativa queda na morbimortalidade nas cirurgias hepáticas. Atualmente a mortalidade encontra-se abaixo de 5% na maioria das grandes casuísticas. Segundo alguns autores a principal causa de mortalidade pós-operatória é a insuficiência hepática pós-ressecção, responsável por até 60% destes casos[1].

A insuficiência hepática pós-ressecção é um quadro grave, que se caracteriza pelo surgimento de icterícia, coagulopatia e encefalopatia hepática após a realização de uma cirurgia hepática. Há controvérsia acerca do seu diagnóstico clínico, sendo os critérios de Balzan [2] e Schindl [3] os mais utilizados.

Três fatores foram identificados como fundamentais na fisiopatologia da insuficiência hepática pós-ressecção: sepse, remanescente hepático de tamanho insuficiente (*small-for-size syndrome*) e a lesão por isquemia-reperfusão (I/R) [4].

A lesão de isquemia-reperfusão (I/R) pode ser definida como o fenômeno em que o dano celular em um tecido submetido à isquemia não letal é agravado pela posterior restauração da oferta de oxigênio. Este fenômeno pode ocorrer em todos os órgãos que dependem de oferta constante de oxigênio através de perfusão ininterrupta, como no fígado, intestino delgado, cérebro, coração e rim.

O estudo da lesão por isquemia-reperfusão avançou ao longo das últimas décadas graças ao uso de diversos modelos experimentais. Grande quantidade de evidências acerca da fisiopatologia da lesão por isquemia-reperfusão foi acumulada desde então, o que permitiu a compreensão, ainda que incompleta, dos mecanismos moleculares envolvidos.



A lesão hepática por I/R é um processo complexo que envolve vários tipos celulares e mediadores moleculares, cuja via final de ação é a morte celular através de combinação de apoptose e necrose. Pode ser dividido em três fases: anóxia, reperfusão precoce e reperfusão tardia [5].

O processo se inicia com a interrupção súbita do fluxo de  $O_2$  (fase de isquemia). Durante esta fase, a ausência de  $O_2$  e o consumo das reservas de glicogênio leva a depleção de ATP, o que causa disfunção nas bombas de troca iônica e alterações na homeostase de  $Na^+$ ,  $H^+$  e  $Ca^{++}$ , determinando assim edema nas células endoteliais sinusoidais (CES), nas células de Kupffer (CK) - macrófagos residentes do fígado - e hepatócitos [6]. Neste momento pode ser identificada a formação de *blebs*, protruções das membranas celulares e do retículo endoplasmático, as alterações mais precoces na hipóxia hepática [7]. Caso não ocorra a normalização do fluxo de  $O_2$  após 30 minutos, o processo evolui para a morte celular. O edema celular aumenta progressivamente, há permeabilização das membranas mitocondriais e lisossomais e, finalmente, os *blebs* coalescem e se rompem, com liberação de enzimas intracelulares, colapso dos gradientes iônicos e necrose celular.

Outra consequência da redução súbita na concentração de ATP e do edema nas CES e CK é a disfunção microcirculatória, resultado da obstrução mecânica ao fluxo causada pelo edema celular e pelo desequilíbrio na produção de endotelina e óxido nítrico (NO), com redução proporcional do último, o que leva ao estreitamento dos sinusóides e agravamento da lesão isquêmica.

A necrose tecidual ocorrida na fase de isquemia leva à liberação de moléculas que normalmente só existem no meio intracelular, tais como a HMGB1, proteínas de choque térmico (HSP), fragmentos de DNA e RNA. Ocorre também a degradação da membrana basal, com a liberação de seus constituintes, tais como sulfato de heparan, ácido hialurônico e fibronectina. Todas estas moléculas são, conjuntamente, denominadas padrões moleculares associados a danos (DAMP) [5]. Elas se caracterizam por ativar o sistema imune inato, gerando uma resposta inflamatória aguda, que é a responsável pelos efeitos sistêmicos e por grande parte dos efeitos locais da lesão por I/R.

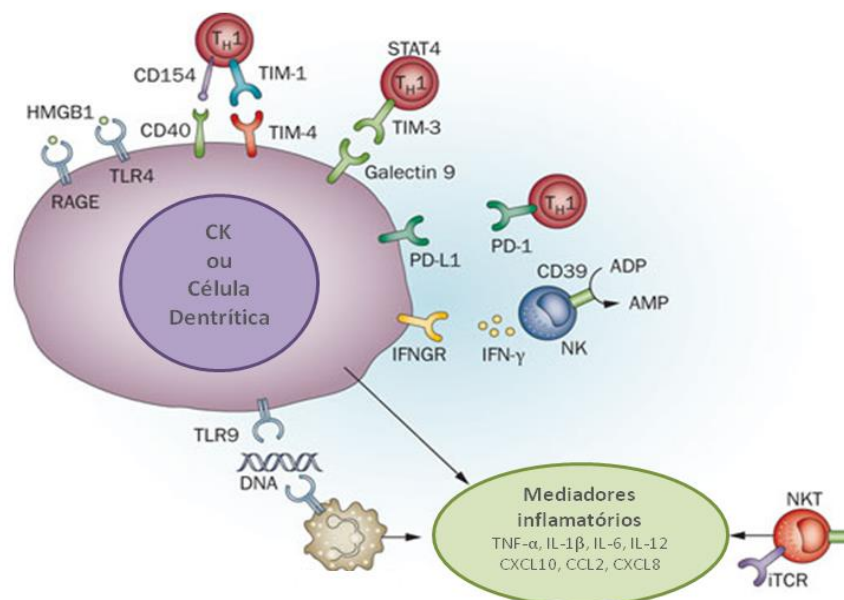
As DAMP são reconhecidas por receptores celulares presentes na CK, células dendríticas e em outras células não parenquimatosas, tais como as CES e as células estreladas. Estes receptores são denominados receptores de

reconhecimento de padrões (PRR). Os mais estudados no mecanismo de I/R hepáticos são os do tipo semelhante ao Toll (TLR) [8].

No fígado, o principal TLR envolvido é o TLR4, e seu ligante mais importante, o HMGB1. Após a ativação do TLR4 há síntese de TRADD3 por meio da via MyD88-independente com produção de TNF- $\alpha$  e CXCL-10 [9]. O TLR9, localizado primariamente nos polimorfonucleares, participa em uma fase mais tardia do processo, ativado pela presença de fragmentos de DNA liberados de células necróticas fagocitadas, sendo responsável por estimular a produção de IL-10 [10].

As CK e células dendríticas, ativadas pelos mecanismos descritos acima, tem papel central na fisiopatologia da lesão por I/R, sendo responsáveis pelo desencadeamento de uma resposta inflamatória aguda clássica. Elas iniciam a produção de radicais livres, principalmente espécies ativadas de oxigênio, e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-6 e IL-18 (Figura 1).

Figura 1 – Ativação da CK (Modificado de Zhai)[11]



Após a restauração do fluxo sanguíneo, temos o início da fase de reperfusão. A ação de quimiocinas e outras citocinas com função quimiotática levam ao recrutamento e infiltração hepática de grande número de neutrófilos e linfócitos. Estes, por sua vez, são responsáveis por amplificar a lesão celular através de mecanismos imuno-mediados, tais como síntese de novas citocinas, produção de radicais livres de oxigênio, ativação do sistema complemento e morte celular mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK.

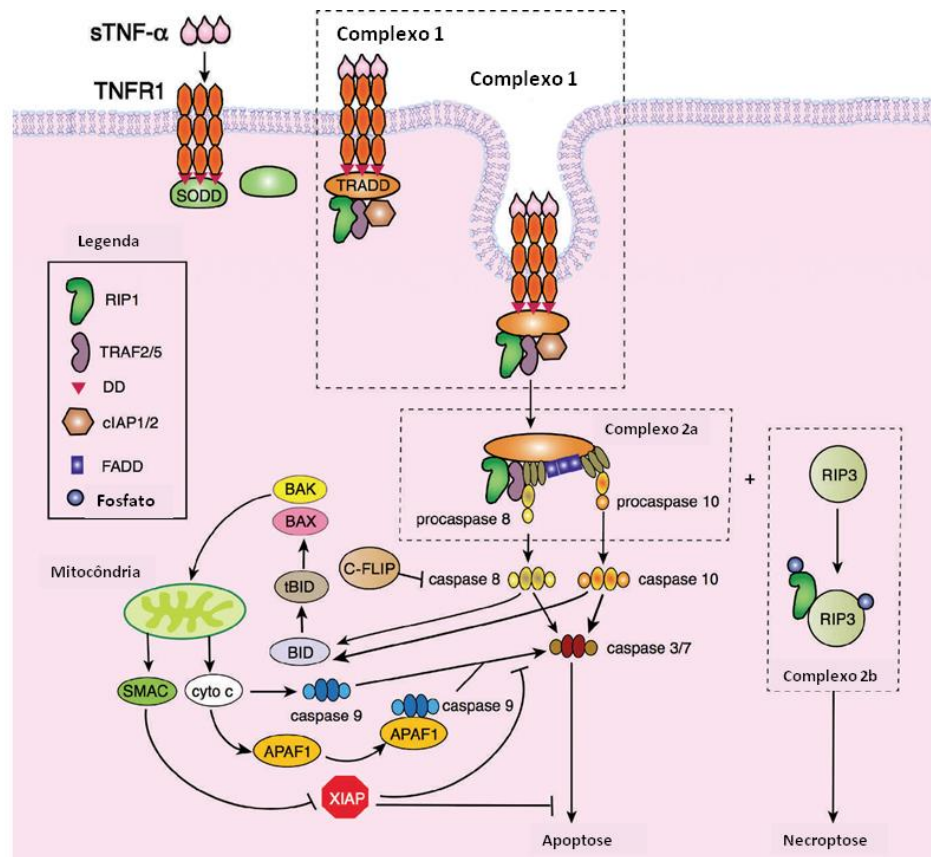
O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é a citocina mais importante no mecanismo de I/R[12]. Após a ligação do TNF- $\alpha$  forma-se um complexo proteico que sofre endocitose e, juntamente com outras proteínas plasmáticas, pode dar origem a dois complexos: o Complexo 2a, que através da associação com as pro-caspases 8 e 10 vai ativar o processo de apoptose; e o Complexo 2b, que leva à morte celular por um mecanismo, recentemente descrito, denominado necrose programada, ou necroptose [13]. Vários autores demonstraram que a necroptose é o principal mecanismo de morte celular nas lesões por I/R nos rins[14], retina[15], miocárdio[16] e fígado[17].

A IL-6 é outra importante citocina produzida durante a lesão por I/R. Alguns trabalhos mostraram que a IL-6 tem efeito hepatoprotetor e indutor da regeneração hepática, sendo fundamental sua ação para a limitação do dano celular nas situações de lesão por I/R[18].

Apesar da grande quantidade de dados relacionados aos mecanismos pró-inflamatórios, se conhece proporcionalmente pouco em relação aos mecanismos que levam à resolução da resposta inflamatória. As principais citocinas que têm efeito anti-inflamatório neste cenário são o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), IL-13 e a IL-10[5].

A IL-10 pertence a uma família de várias citocinas (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B e IL-29) que compartilham uma estrutura similar. É produzida por diversas células do sistema imunológico, como os macrófagos, linfócitos T reguladores e linfócitos T auxiliares. Seu receptor (IL-10R) pertence ao grupo dos receptores de citocina do tipo II (semelhantes aos receptores de interferon). Após a ligação com o IL-10R ocorre a ativação das cinases JAK1 e TYK2 que levam à síntese de STAT3. Seu efeito principal sobre o sistema imunológico é a inibição dos macrófagos e células dendríticas[19].

Figura 2 – Via de sinalização do TNFR1. (Adaptado de Shuh) [12].



O resultado final de todo este processo é a lesão tecidual hepática decorrente do processo de I/R. O grau de dano tecidual é proporcional à duração da fase de isquemia e da presença de alteração parenquimatosa prévia (esteatose, hepatite crônica, cirrose)[20].

Devido ao grande impacto que a lesão por I/R tem no resultado das ressecções hepáticas e no transplante, uma grande quantidade de estudos foi realizada na tentativa de desenvolver estratégias que atenuassem seus efeitos.

O pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) foi descrito por Przyklenk em 1993 [21] em um modelo canino de isquemia miocárdica. O primeiro trabalho demonstrando a aplicação do PCIR na proteção hepática à lesão por I/R foi publicado por Kanoria em 2006 [22]. Desde então alguns trabalhos foram publicados mostrando eficácia do PCIR na proteção hepática.

No entanto o mecanismo molecular responsável por seus efeitos ainda não foi esclarecido. A estimulação nervosa, produção de mediadores pela resposta sistêmica induzida pela isquemia, adenosina, citocinas e mediadores intracelulares já foram propostos como agentes efetores da PCIR [23].

Existem assim diversas lacunas na compreensão dos mecanismos de ação do PICIR, havendo necessidade de mais estudos para que seus mediadores e vias de ativação seja esclarecido, o que permitirá o seu futuro emprego nas cirurgias.

## 1 OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

Avaliar do efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) em um modelo experimental de lesão por isquemia-reperfusão hepática.

### **Objetivos Específicos:**

1. Avaliar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos modelos de IR e PCIR.
2. Avaliar a injúria hepática nos grupos IR e PCIR através da dosagem de transaminase sérica (ALT) e estudo histopatológico.

## 2 MÉTODO

Foi utilizado um modelo experimental, em ratos, de lesão por isquemia-reperfusão hepática, associado ao pré-condicionamento isquêmico remoto. Realizou-se estudo morfológico dos lobos hepáticos, avaliação bioquímica com dosagem de ALT e estudo da resposta inflamatória através da análise da expressão das citocinas TNF-alfa, IL-6 e IL-10.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), com colaboração de docentes do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento do Departamento de Ciências Fisiológicas, e do Laboratório Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia, ambos do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ.

### 2.1 Animais e grupos

Foram utilizados 36 ratos adultos (*Rattus norvegicus*), machos, da raça *Sprague Dawley*, com peso entre 280 e 300 gramas, divididos aleatoriamente em três grupos de 12 animais, conforme o tipo de procedimento a que foram submetidos:

- Grupo Sham: Cirurgia simulada
- Grupo IR Isquemia-reperfusão
- Grupo PCIR: Pré-condicionamento isquêmico remoto

Todos os animais foram provenientes do Biotério do LCE - UERJ e receberam ração comercial apropriada e água *ad libitum*, até obterem o peso ideal para o início do experimento.

Os ratos foram alocados em gaiolas individuais e mantidos em condição-padrão de laboratório climatizado e com períodos claro-escuro de 12 horas durante toda a duração do experimento.

Os animais foram submetidos à anestesia com cloridrato de cetamina (50mg/kg) + cloridrato de xilazina (20mg/kg), por via intramuscular. O procedimento foi realizado conforme a alocação nos grupos.

### 2.1.1 Grupo Sham

Foi realizada laparotomia mediana supra-umbilical, de 4 cm, seguida de mobilização do fígado por meio de liberação de suas fixações ligamentares, reposição volêmica através de instilação de 1,0 ml de soro fisiológico aquecido, e fechamento da laparotomia, com sutura contínua, em dois planos, com Prolene 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil) (Figura 3).

Figura 3 – Procedimento cirúrgico do Grupo Sham



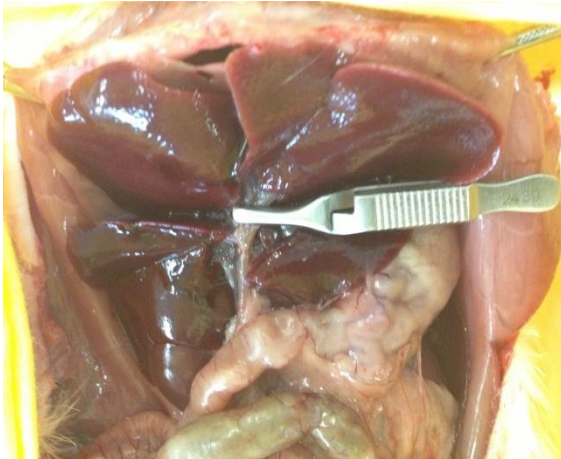
### 2.1.2 Grupo IR

Após a realização da laparotomia, como descrito para o Grupo Sham (cirurgia simulada), o pedículo portal responsável pela vascularização dos lobos esquerdo e medial foi identificado e, em seguida, realizada sua oclusão com clampe vascular curvo tipo Dieffenbach (Lang Medical, Cachoeiro de Macacú, RJ, Brasil) (Figura 4). Após 45 minutos de isquemia, retirou-se o clampe para permitir a reperfusão dos



lobos. Em seguida, foi feita a reposição volêmica e fechamento da laparotomia conforme descrito para o Grupo Sham.

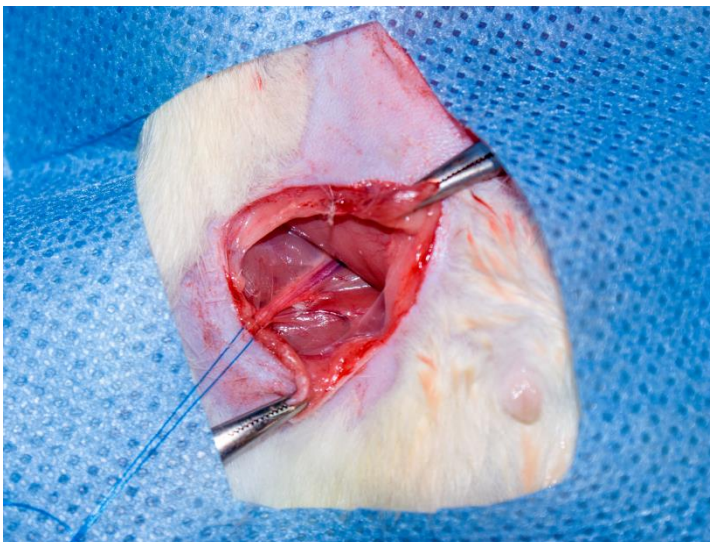
Figura 4 – Clampeamento do pedículo portal para os lobos esquerdo e medial.



### 2.1.3 Grupo PCIR

Após incisão transversa na região inguinal da pata traseira direita, procedeu-se à identificação e isolamento dos vasos (artéria e veia femoral) responsáveis pela irrigação do membro (Figura 5). Em seguida, foram aplicados seis ciclos de isquemia-reperfusão da pata, com 4 minutos de isquemia e 4 minutos de reperfusão em cada ciclo. A incisão foi fechada com pontos simples de mononylon 4-0 (Brasuture, São Sebastião da Gramma, SP, Brasil). Ao término do PCIR, foram realizados os procedimentos como descritos para o Grupo IR.

Figura 5 – Clampeamento do pedículo vascular para a pata inferior direita



## 2.2 Delineamento temporal do experimento

Após o término dos procedimentos cirúrgicos, em cada grupo, metade dos animais era morta após 60 minutos de reperfusão e, a outra metade, após 180 minutos.

Imediatamente antes da morte de cada animal foi colhido sangue, através de punção cardíaca percutânea, e retirado os lobos esquerdo e medial do fígado. O sangue foi coletado em tubo contendo EDTA (BD Vacutainer EDTA K2, BD Diagnostics, São Paulo, SP) e acondicionado imediatamente em recipiente com gelo; a peça cirúrgica foi armazenada em frasco contendo solução de formalina tamponada a 10%. Ao término da coleta do material acima descrito os animais foram mortos por sobredose de tiopental sódico.

## 2.3 Processamento do material

### 2.3.1 Separação do plasma

Imediatamente após a coleta, o sangue foi submetido a processamento para separação do plasma. Os tubos com sangue total foram centrifugados a 2500 RPM por 15 minutos, a 4<sup>o</sup>C. Em seguida, a fração correspondente ao plasma foi coletada e armazenada a - 70 <sup>o</sup>C para posterior análise.

### 2.3.2 Processamento histológico

Os lobos hepáticos coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10% foram submetidos ao processo de desidratação, através de baterias crescentes de álcool e diafanizado com xilol. Em seguida, o material foi banhado e incluído em parafina líquida. Os blocos formados foram seccionados em cortes de 5 µm, coletados em lâminas e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

## 2.4 Dosagem das citocinas

As citocinas (TNF-alfa, IL-6 e IL-10) foram dosadas através da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com uso de kit comercial específico para dosagem destas interleucinas em ratos (ER90133Ra, ER90079Ra, ER90056Ra, Uscn Lifesciences, Texas, EUA). Inicialmente o reagente foi reconstituído em 1,0 ml do diluente padrão. Em seguida foi realizada uma diluição em série deste diluente em oito passagens, com a criação de amostras com concentrações de 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml e 7,8 pg/ml. Estas amostras foram utilizadas posteriormente para construção de uma curva padrão. Em seguida foram colocadas 100 µl da amostra de plasma, em duplicata, em cada poço da placa e incubado a 37<sup>o</sup> C por 2 horas. Após a remoção do líquido em cada poço, foram colocados 100 µl do reagente de detecção A em cada um deles, a placa foi coberta e novamente incubada a 37<sup>o</sup> C por 60 minutos. Na etapa seguinte cada poço foi lavado três vezes com a solução tampão, foi colocado 100 µl do reagente de detecção B e a placa colocada na incubadora, a 37<sup>o</sup> C, por mais 30 minutos. Em seguida a placa foi lavada com a solução tampão por cinco vezes e adicionados 90 µl do substrato. A placa foi colocada na incubadora por 20 minutos. Assim que foi retirada da incubadora, foram colocados 50 µl da solução STOP em cada poço. Terminada a reação de ELISA, a placa foi inserida em leitor de microplacas (Stat Fax 2100, Awareness Technologies, FL, EUA) calibrado para leitura em 450 nm. Os resultados medidos pelo aparelho foram analisados no pacote estatístico GrapPad Prism. Após a construção de uma curva padrão e criação de um modelo de regressão linear, os valores das concentrações séricas foram inferidos a partir da densidade óptica de cada amostra.

## 2.5 Transaminases hepáticas

A dosagem de ALT no plasma foi realizada através de método cinético utilizando o analisador Bioclin Systems II e o kit K049 (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme indicação do fabricante.

## 2.6 Estudo histopatológico

Para avaliação histológica da injúria hepática, as seções histológicas coradas foram observadas ao microscópio de luz Olympus BX-51 e as imagens foram capturadas utilizando um sistema de vídeo-microscopia. A quantificação da injúria hepática foi feita através do Escore Modificado de Injúria Hepática (*Modified Liver Injury Score*) (Tabela 1) a partir da análise de cinco campos aleatórios, capturados com objetiva de 40x, de três lâminas histológicas de cada animal, totalizando 180 campos por grupo.

Tabela 1 – Classificação das alterações histopatológicas da lesão I/R (continua)

Alteração	Pontuação	Interpretação
Histopatológica		
Infiltração neutrófilos	0	Nenhuma
	1	Rara
	2	Espalhada em alguns lóbulos
	3	Espalhada na maioria dos lóbulos
	4	Nas confluências lobulares
	5	Agrupamentos densos
Necrose celular	0	Nenhuma
	1	1-2 corpos apoptóticos
	2	>3 corpos apoptóticos
	3	1-2 focos de necrose
	4	3 ou mais focos de necrose

5 1 área de necrose confluyente

Tabela 1 – Classificação das alterações histopatológicas da lesão I/R (continuação)

	6	Múltiplas áreas de necrose confluyente
	7	Área de necrose maior que o tecido viável
	8	Nenhum ou quase nenhum tecido viável
Alterações eosinofílicas	0	Nenhuma
	1	Raras
	2	Espalhada em alguns lóbulos
	3	Espalhado na maioria dos lóbulos
	4	Generalizada
Desarranjo celular	0	Leve
	1	Moderado
	2	Acentuado
Balonização hepatócitos	0	Nenhum
	1	Focal
	2	Alguns lóbulos afetados
	3	Maioria dos lóbulos afetados
	4	Generalizado
Vacuolização citoplasmática	0	Nenhuma
	1	Rara
	2	Espalhada em alguns lóbulos
	3	Espalhada na maioria dos lóbulos
	4	Generalizada

Tabela 1 – Classificação das alterações histopatológicas da lesão I/R (conclusão).

Extravasamento	0	Nenhum
Hemácias	1	Raro
	2	Perivenular
	3	Perivenular zona média
	4	Panlobular
Dilatação sinusoidal	0	Ausente
	1	Rara
	2	Perivenular
	3	Perivenular zona média
	4	Panlobular

---

Fonte: Adaptado de ABU-AMARA, 2012

## 2.7 Análise estatística

Análises estatísticas foram utilizadas para comparação entre os grupos da expressão de TNF-alfa, IL-6 e IL-10, do escore de injúria hepática e da dosagem de ALT.

Para análise da expressão das citocinas e dosagem das enzimas hepáticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Holm-Sidak para comparação entre grupos.

Na comparação dos escores de injúria celular foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, um método não-paramétrico, e o pós-teste de Dunn para comparação entre grupos.

Foi utilizado o pacote estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, Califórnia, EUA) para os cálculos; e em todas as análises, um valor de  $p \leq 0,05$  foi estabelecido para a rejeição da hipótese nula.

## **2.8 Aspectos éticos nos cuidados com animais**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o número 035/2011.

Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais[24].

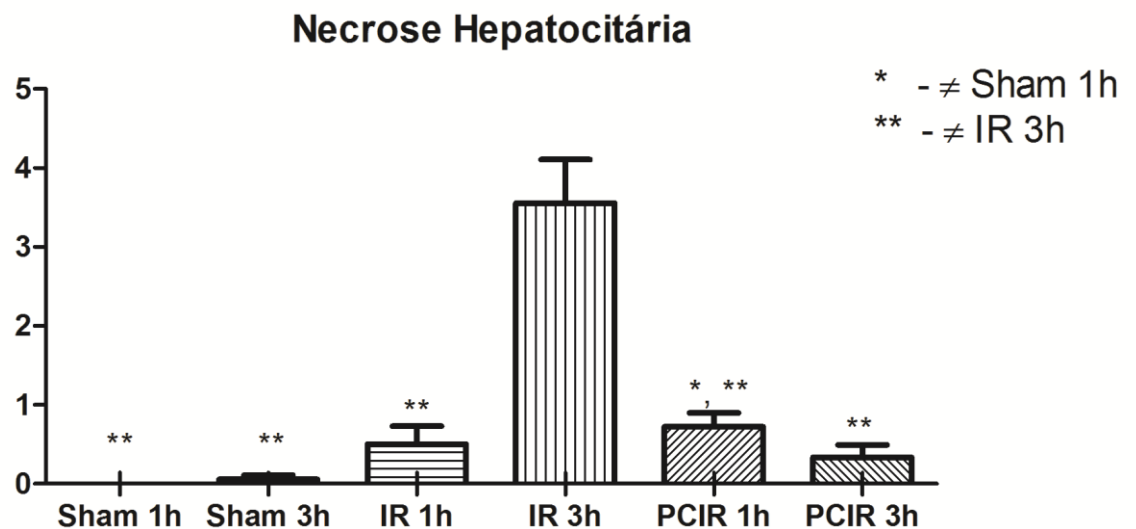
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise histopatológica

##### 3.1.1 Necrose hepatocitária

Quando foi analisada a presença de necrose, o grupo IR 3h apresentou necrose significativamente maior que a identificada em todos os outros grupos: Sham 1h (3,56 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ), grupo Sham 3h (3,56 vs 0,06,  $p < 0,05$ ), grupo IR 1h (3,56 vs 0,5,  $p < 0,0001$ ), grupo PCIR 1h (3,56 vs 0,72,  $p < 0,01$ ) e grupo PCIR 3h (3,56 vs 0,33,  $p < 0,0001$ ). Foi notada também necrose significativamente maior no grupo PCIR 1h quando comparado com o grupo Sham 1h (0,72 vs 0,0,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos PCIR 1h e PCIR 3h (0,72 vs 0,33) (Figura 6 e Gráfico 1)

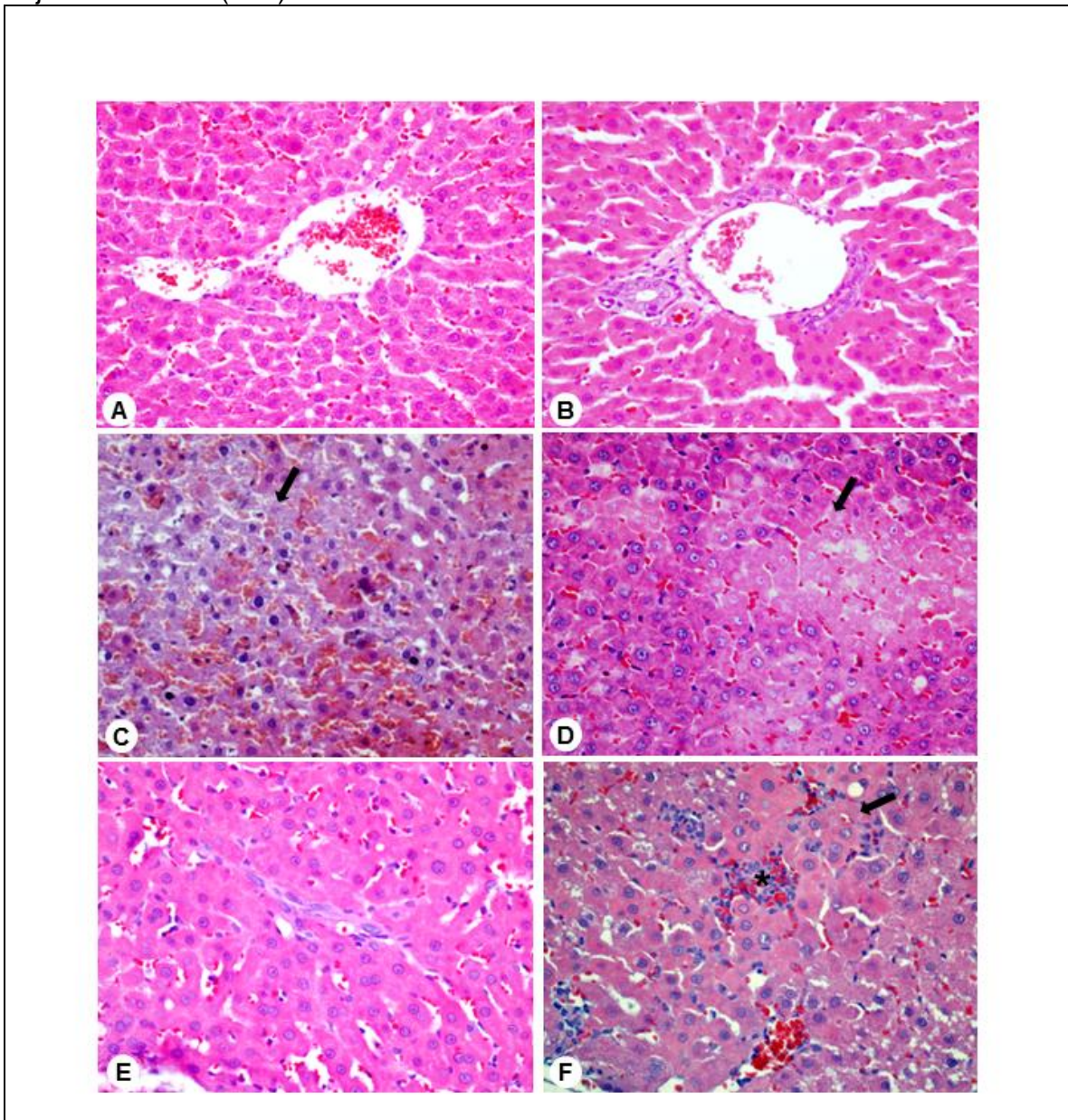
Gráfico 1 – Avaliação da presença de necrose hepatocitária após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.



**Legenda:** A barra representa a média ± EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos IR 3h e os outros grupos ( $p < 0,0001$ ).



Figura 6– Fotomicrografias de tecido hepático corado com hematoxilina-eosina, objetiva de 40X. (A-B)



Legenda: A – Grupo Sham 1h; B Grupo Sham 3h; C – Grupo IR 1h; D – Grupo IR 3h; E - Grupo PCIR 1h; E – Grupo PCIR 3h

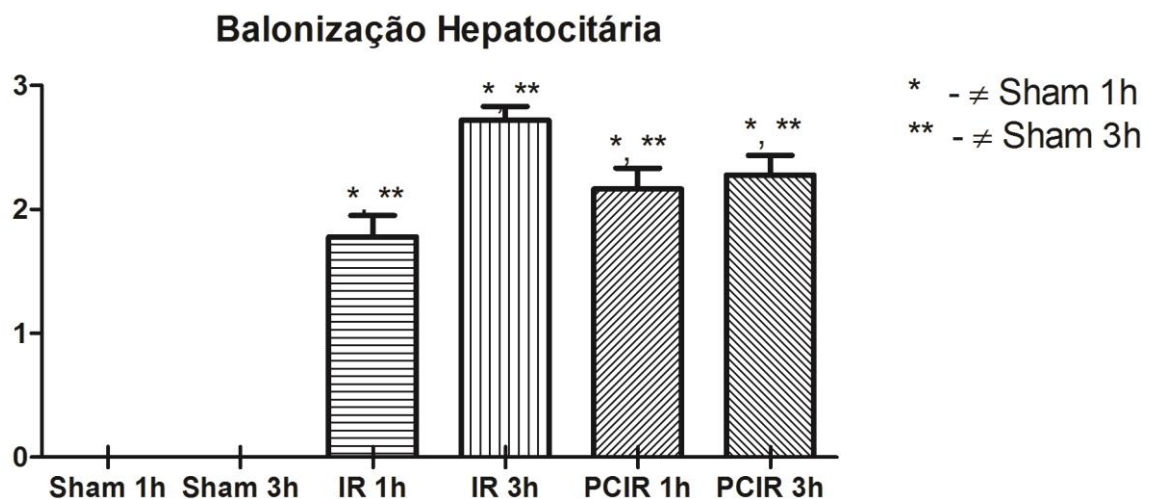
Nota: A e B demonstrando arquitetura tecidual normal. (C) qual observa-se lesões celulares reversíveis (seta). (D) apresentando área de necrose celular (seta). (E) observa parênquima hepático semelhante ao grupo Sham. (F) apresentando eosinofilia citoplasmática (seta) e presença de infiltrado inflamatório associado à extravasamento de hemácias (asterisco).

Fonte: GUIMARÃES FILHO, 2013

### 3.1.2 Balonização hepatocitária

A avaliação da presença de balonização hepatocitária mostrou aumento significativo da sua presença no grupo IR 1h quando comparado ao grupo Sham 1 h (1,78 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e o grupo Sham 3h (1,78 vs 0,0,  $p < 0,0001$ ). Houve aumento da balonização no grupo IR 3h quando comparado aos grupos Sham 1h (2,72 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,72 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ). O grupo PCIR 3h apresentou balonização significativamente maior que os grupos Sham 1h (2,17 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,7 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ). Também houve aumento significativo da balonização nos grupo PCIR 3h quando comparados aos grupos Sham 1h (2,28 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,28 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ). Não houve diferença na balonização hepatocitária entre os grupos IR e PCIR (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Avaliação da presença de balonização hepatocitária após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.

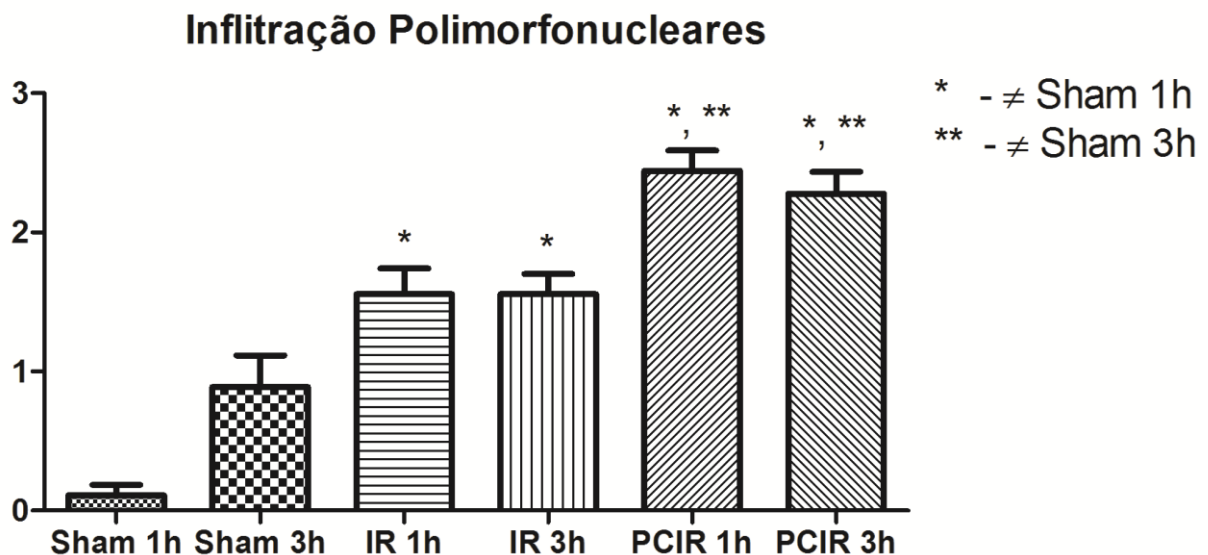


Legenda: A barra representa a média  $\pm$  EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo sham e os outros grupos ( $p < 0,0001$ ). Não foi identificada diferença significativa entre os grupos IR e PCIR.

### 3.1.3 Infiltrado de polimorfonucleares

A identificação de infiltração de polimorfonucleares foi maior no grupo PCIR 1h que nos grupos Sham 1h (2,44 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3 h (2,44 vs 0,89,  $p < 0,0001$ ). No grupo PCIR 3 h também houve aumento significativo na infiltração de neutrófilos quando comparados aos grupos Sham 1h (2,28 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,28 vs 0,89,  $p < 0,0001$ ). Também foi identificada diferença significativa entre os grupos IR 1h e o grupo Sham 1h (1,56 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ), e entre os grupos IR 3h e Sham 1h (1,56 vs 0,11  $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os grupos IR e PCIR (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Avaliação da presença de infiltração de polimorfonucleares após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão

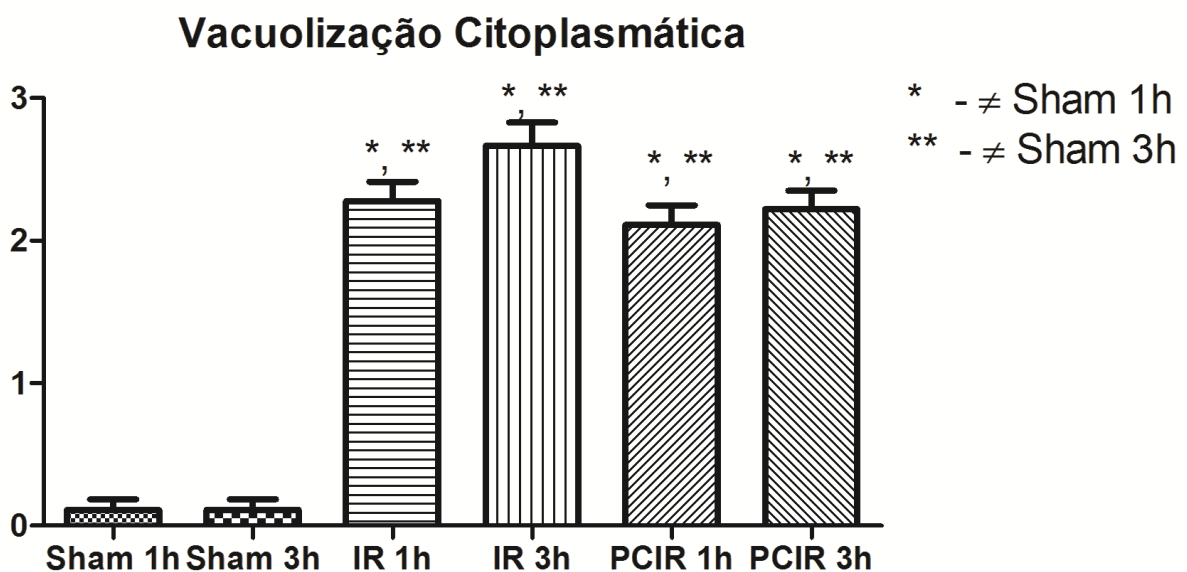


Legenda: . A barra representa a média ± EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Sham e os outros grupos ( $p < 0,0001$ ). Não foi identificada diferença significativa entre os grupos IR e PCIR.

### 3.1.4 Vacuolização citoplasmática

O estudo da vacuolização citoplasmática mostrou aumento significativo da vacuolização no grupo IR 1h quando comparado ao grupo Sham 1h (2,28 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e ao grupo Sham 3h (2,28 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ). O grupo IR 3h também demonstrou aumento significativo quando comparado aos grupos Sham 1h (2,67 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,67 vs 0,11,  $P < 0,0001$ ). O grupo PCIR 1h teve aumento da vacuolização em comparação com os grupos Sham 1h (2,11 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,11 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ). O grupo PCIR 3h também mostrou aumento quando comparado aos grupos Sham 1h (2,22 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,22 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos IR e PCIR (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Avaliação da presença de vacuolização citoplasmática após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.

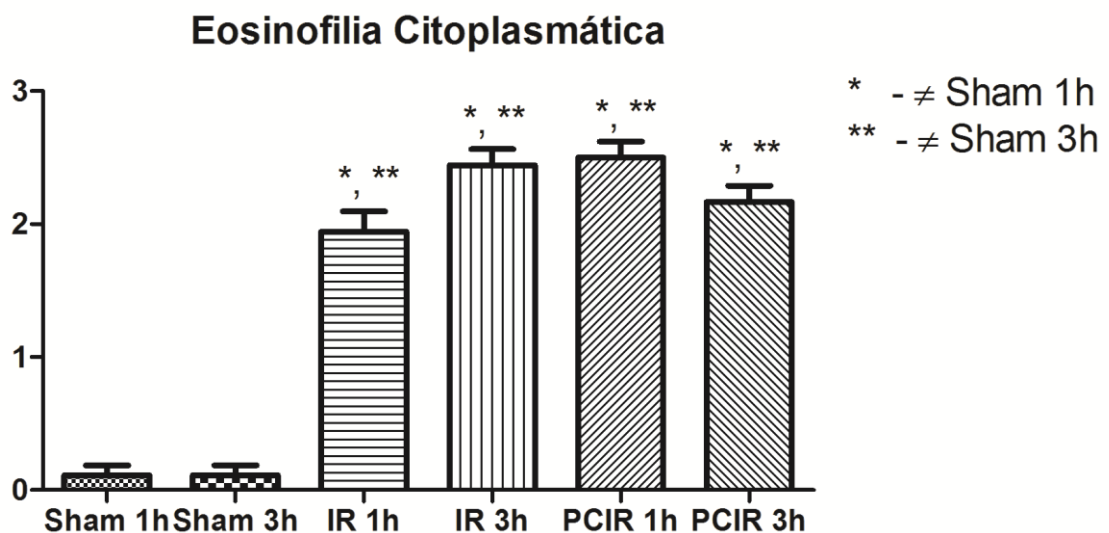


Legenda: A barra representa a média ± EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo sham e os outros grupos ( $p < 0,0001$ ). Não foi identificada diferença significativa entre os grupos IR e PCIR.

### 3.1.5 Eosinofilia Citoplasmática

A eosinofilia citoplasmática mostrou-se aumentada de forma significativa no grupo IR 1h quando comparado ao grupo Sham 1h (1,94 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e ao grupo Sham 3h (1,94 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ). O grupo IR 3h também demonstrou aumento significativo quando comparado aos grupos Sham 1h (2,44 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,44 vs 0,11,  $P < 0,0001$ ). O grupo PCIR 1h teve aumento da presença de eosinofilia em comparação com os grupos Sham 1h (2,50 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,50 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ). O grupo PCIR 3h também mostrou aumento em relação aos grupos Sham 1h (2,17 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,17 vs 0,11,  $p < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos IR e PCIR (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Avaliação da presença de eosinofilia hepatocitária após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão



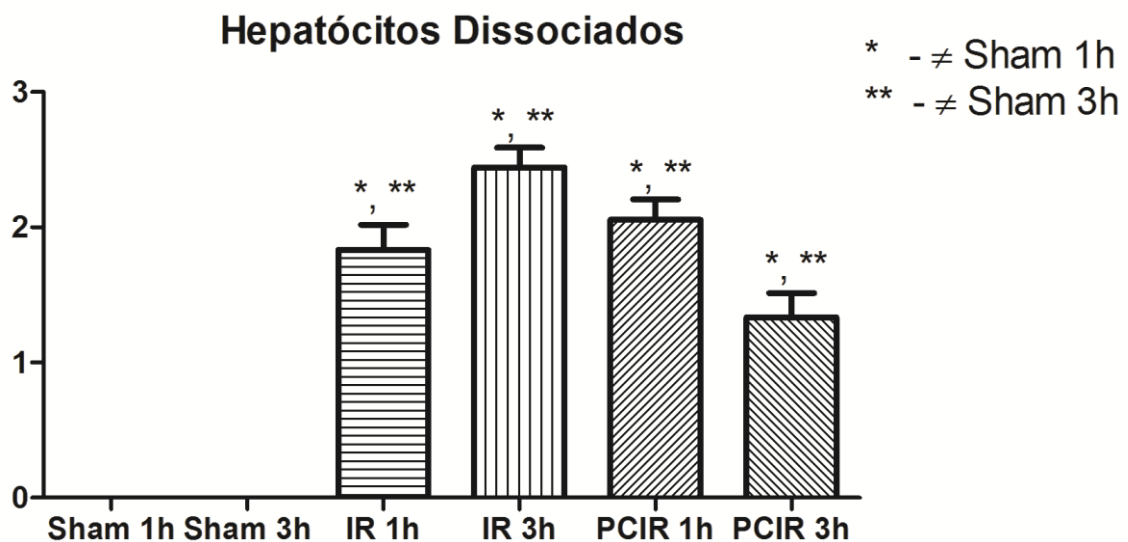
Legenda: A barra representa a média ± EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Sham e os outros grupos. ( $p < 0,0001$ ) Não foi identificada diferença significativa entre os grupos IR e PCIR.



### 3.1.6 Dissociação hepatocitária

A identificação de desarranjo dos hepatócitos foi mais frequente no grupo IR 1h quando comparado ao grupo Sham 1h (1,83 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e ao grupo Sham 3h (1,83 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ). O grupo IR 3h também demonstrou aumento significativo na presença de hepatócitos dissociados quando comparado aos grupos Sham 1h (2,44 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,44 vs 0,00,  $P < 0,0001$ ). O grupo PCIR 1h teve aumento na identificação de dissociação dos hepatócitos em comparação com os grupos Sham 1h (2,06 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (2,06 vs 0,00,  $p < 0,0001$ ). O grupo PCIR 3h também mostrou aumento em relação aos grupos Sham 1h (1,33 vs 0,00,  $p < 0,001$ ) e Sham 3h (1,33 vs 0,11,  $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os grupos IR e PCIR (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Avaliação da presença de hepatócitos dissociados após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão

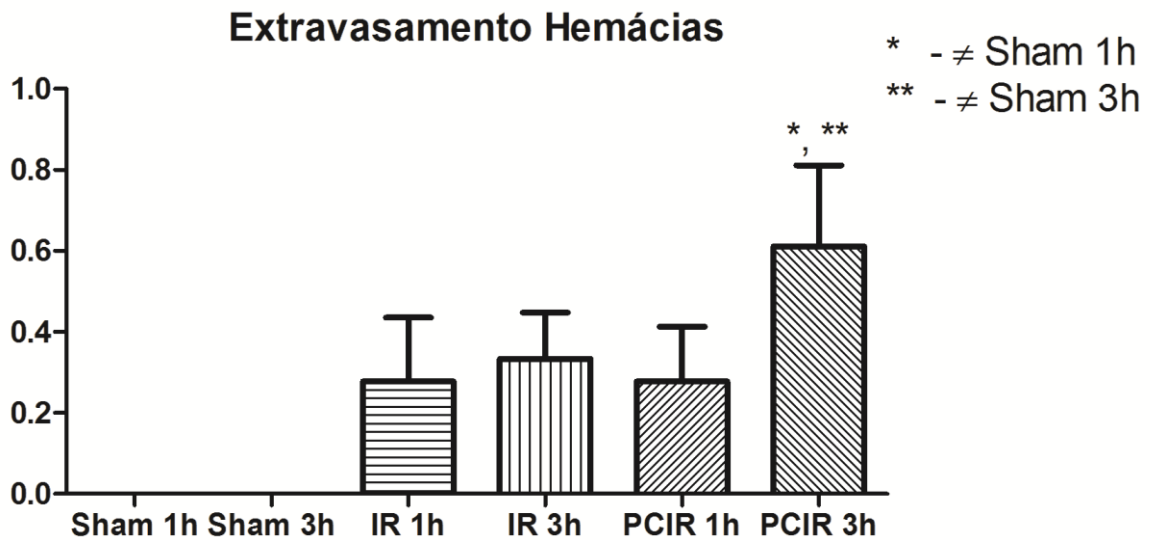


Legenda: . A barra representa a média ± EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Sham e os outros grupos ( $p < 0,001$ ). Não foi identificada diferença significativa entre os grupos IR e PCIR.

### 3.1.7 Extravasamento de hemácias

O extravasamento de hemácias (hemácias fora do espaço sinusoidal) foi maior nos grupo PCIR 3h quando comparado aos grupos Sham 1h (0,61 vs 0,00,  $p < 0,05$ ) e Sham 3h (0,67 vs 0,00,  $p < 0,05$ ). Não foi identificado aumento significativo na comparação entre os outros grupos (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Avaliação da presença de extravasamento de hemácias após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.

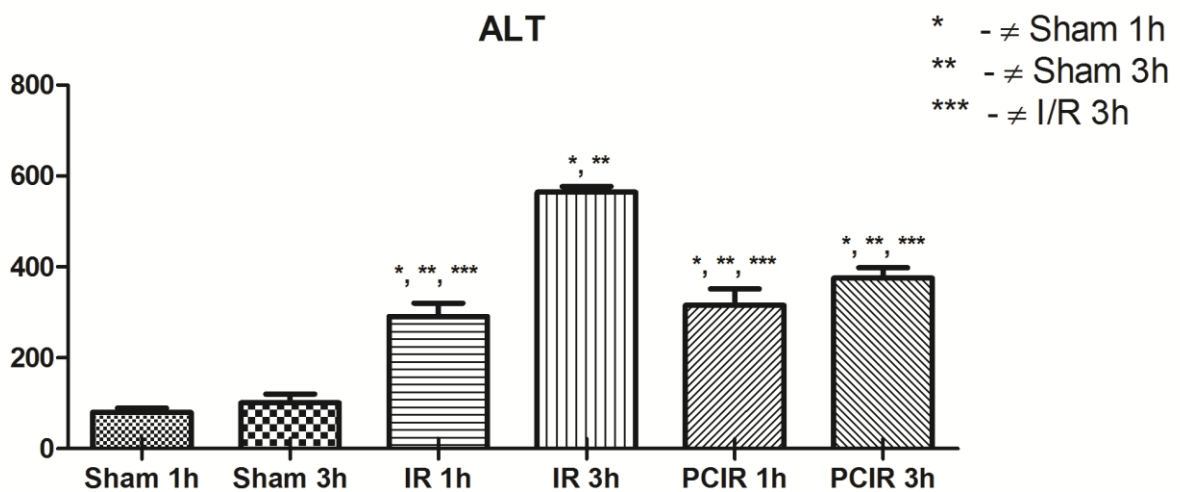


Legenda: A barra representa a média  $\pm$  EPM de 18 observações por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo Sham e o grupo PCIR 3h ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Transaminases

Na dosagem de ALT plasmática, o grupo com os maiores valores foi o Grupo IR 3h, com diferença significativa quando comparado aos grupos Sham 1h (564,0 vs 80,5  $p < 0,001$ ), Sham 3h (564,0 vs 100,8,  $p < 0,001$ ), PCIR 1h (564,0 vs 315,8,  $p < 0,001$ ) e PCIR 3h (564,0 vs 375,4  $p < 0,01$ ). Houve também diferença significativa entre os grupos PCIR 1h e os grupos Sham 1h (315,8 vs 80,5,  $p < 0,001$ ) e Sham 3h (315,8 vs 100,8,  $p < 0,001$ ). Não foi identificada diferença entre os grupos PCIR 1h e PCIR 3h (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Dosagem de ALT após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.



Legenda: A barra representa a média  $\pm$  EPM de 12 amostras por grupo. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo IR 3h e os outros grupos ( $p < 0,001$ ). Também foi identificada diferença entre os grupos Sham e os grupos I/R e PCIR ( $p < 0,001$ ). Não foi identificada diferença significativa entre os grupos PCIR.



### 3.3 Dosagem das citocinas plasmáticas

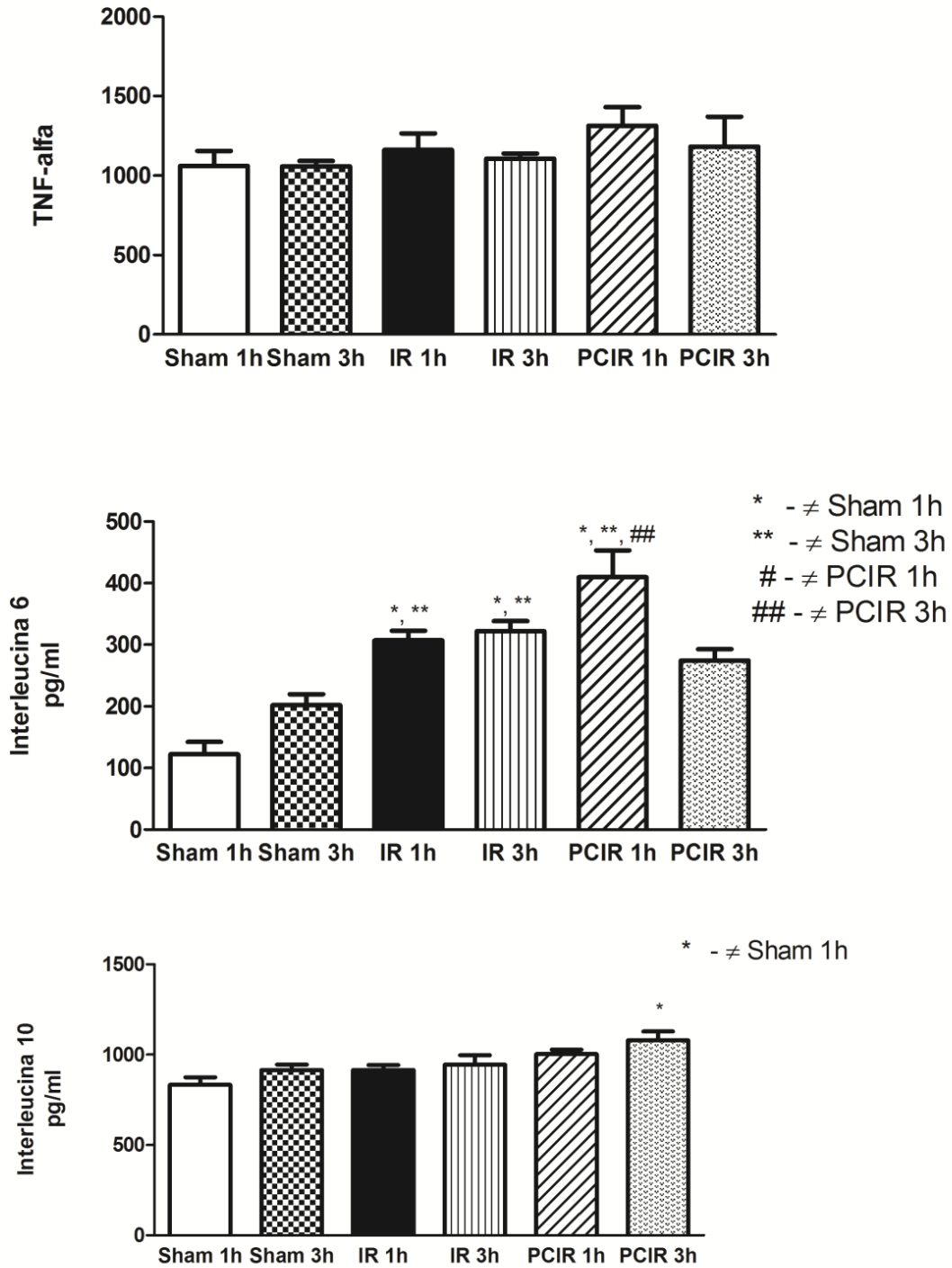
Os resultados da análise da dosagem plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 pela técnica de ELISA estão representados no Gráfico 9.

A dosagem plasmática do TNF- $\alpha$  mostrou que os grupos IR e PCIR apresentaram valores superiores aos encontrados nos grupo Sham, porém esta diferença não alcançou diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença entre os grupos IR e PCIR.

A análise dos valores de IL-6 mostrou aumento significativo no grupo PCIR 1h quando comparados aos grupos Sham 1h (409,8 vs 122,5,  $p < 0,0001$ ), Sham 3h (409,8 vs 202,5,  $p < 0,0001$ ) e PCIR 3h (409,8 vs 274,6,  $p < 0,05$ ). O grupo PCIR 1h mostrou média superior à encontrada nos grupos IR 1h (409,8 vs 307,2) e IR 3h (409,8 vs 322,4) porém esta diferença não alcançou significância estatística. O grupo IR 1h mostrou valores significativamente maiores que os grupos Sham 1h (307,2 vs 122,5,  $p < 0,001$ ) e Sham 3h (307,2 vs 202,5,  $p < 0,05$ ). O grupo IR 3h mostrou elevação significativa dos valores de IL-6 quando comparados aos grupos Sham 1h (322,4 vs 122,5,  $p < 0,0001$ ) e Sham 3h (322,4 vs 202,5,  $p < 0,05$ ).

No estudo da IL-10 notaram-se valores maiores nos grupos PCIR 3 h quando comparados aos grupos IR 3h (1080 vs 944,6), IR 1h (1080 vs 915,4), Sham 1h (1080 vs 833,2) e Sham 3h (1080 vs 915,7), porém esta diferença só foi significativa na comparação entre os grupos PCIR 3h e Sham 1h (1080 vs 833,2,  $p < 0,05$ ).

Gráfico 9 - Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) plasmáticas após 60 minutos e 180 minutos de reperfusão.



Legenda: Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 12 amostras por grupo. Na dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-10 não houve diferença significativa entre os grupos. Na dosagem de IL-6 houve diferença significativa entre os grupos IR e PCIR.

#### 4 DISCUSSÃO

A lesão por I/R é um dos mecanismos fisiopatológicos mais importantes no desenvolvimento da insuficiência hepática pós-resssecção e na disfunção primária de enxerto no pós-operatório dos transplantes hepáticos. Sua relevância na cirurgia hepatobiliar se traduz nas centenas de estudos que foram realizados no intuito de compreender seus mecanismos e no desenvolvimento de estratégias para minimizar os seus efeitos deletérios.

Estas estratégias podem ser divididas em duas grandes categorias: cirúrgicas e farmacológicas. Neste grupo temos um grande número de drogas que, pelo menos em estudos experimentais, mostraram um impacto positivo em relação à redução da lesão hepática por I/R. Dentre elas temos os anestésicos halogenados como o sevoflurano, que reduziu a lesão celular por I/R [25]. Assim, para evitar a introdução de um possível viés neste estudo, o uso de anestésicos inalatórios foi evitado, sendo escolhida como técnica anestésica a injeção intramuscular de solução de cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg), procedimento anestésico de uso rotineiro no Laboratório de Cirurgia Experimental da FCM – UERJ, que se mostrou eficiente, seguro e de fácil execução.

Os modelos animais foram amplamente empregados no estudo da lesão hepática por I/R. Os roedores são os animais de experimentação mais utilizados, já que tem ampla disponibilidade, envolvem menos conflitos éticos e há disponibilidade de reagentes, anticorpos e outros insumos para estudos de biologia molecular e imunohistoquímica. Além da espécie, outras variáveis importantes na seleção de um modelo experimental incluem a idade e o gênero do animal. Os animais adultos (em torno de 250g) são os mais utilizados, já que os muito jovens apresentam maior resistência à lesão por I/R e suas reduzidas dimensões dificultam a manipulação cirúrgica; e os mais velhos (250-400g) apresentam risco maior de complicações respiratórias pós-operatórias. Há grande influência dos hormônios sexuais femininos na resistência do tecido hepático à isquemia, portanto são utilizados apenas animais machos na grande maioria dos trabalhos experimentais. No presente trabalho optou-se pelo uso de ratos da raça Sprague-Dawley como animais de experimentação pelos motivos discutidos acima. O peso dos animais, entre 250 e 280 g, foi escolhido por apresentar uma boa correlação entre tamanho e risco de complicações pós-operatórias.

Estes modelos podem ser classificados em duas categorias: isquemia hepática global e isquemia hepática parcial.

As técnicas de isquemia global tem como base o clampeamento do ligamento hepatoduodenal, com interrupção total do fluxo sanguíneo hepático, o que determina isquemia em todo o fígado. Sua principal vantagem é mimetizar o que ocorre na prática clínica, pois é semelhante à manobra de Pringle, utilizada nos procedimentos cirúrgicos hepáticos de grande porte. No entanto apresentam um grande inconveniente: a interrupção do fluxo na veia mesentérica superior e na veia porta leva a alto risco de isquemia mesentérica e endotoxemia por via portal. Para contornar estas complicações foram desenvolvidas diversas técnicas para decompressão portal durante o período de isquemia global: shunts porto-sistêmicos com tubos revestidos com endotélio [26] e anastomoses porto-sistêmicas, como os shunts portofemoral, mesentericocaval e esplenocaval [27]. Outra estratégia de decompressão portal - a transposição esplênica –descrita por Meredith e Wade em 1981 - consiste na transposição do baço para o subcutâneo[28]. Em poucas semanas se desenvolve circulação colateral porto-sistêmica extensa suficiente para garantir uma decompressão portal eficiente durante o clampeamento do ligamento hepatoduodenal.

Os modelos de isquemia parcial se caracterizam pelo clampeamento de um pedículo lobar, determinando isquemia de apenas uma parte do parênquima hepático. A técnica mais empregada foi descrita por Yamauchi em 1982 [29] e consiste no clampeamento do pedículo portal comum aos lobos medial e esquerdo. Como não há interrupção do retorno venoso portal, não há necessidade de realização de shunt porto-sistêmico. Assim temos isquemia de massa considerável de hepatócitos (70%) através de um procedimento cirúrgico simples.

Por sua simplicidade e eficácia, a técnica de Yamauchi foi selecionada como o procedimento a ser empregado no Grupo IR. Todos os animais submetidos a esta técnica toleraram bem este procedimento, não tendo sido identificada nenhuma complicação intestinal ou infecciosa no pós-operatório.

A lesão hepática por I/R pode ser dividida em duas fases: uma precoce, com duração de 2 a 3 horas, em que se observa a ativação das CK, produção de citocinas (principalmente TNF- $\alpha$ ) e lesão hepatocelular moderada com liberação de transaminases; e uma tardia, que se estende de seis até 48 horas, caracterizada pela infiltração de neutrófilos e lesão hepatocelular extensa mediada por radicais

livres de oxigênio e outras substâncias citotóxicas produzidas pelos neutrófilos [30], sendo o pico de necrose identificado em torno de 6 horas de reperfusão[11]. Como o presente trabalho é o primeiro em uma linha de pesquisa em PCIR iniciada recentemente no Departamento de Cirurgia Geral da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, optou-se por estudar a fase precoce da lesão por I/R, limitando o tempo máximo de reperfusão em 3 horas.

Diversas estratégias cirúrgicas para modulação da lesão por I/R foram desenvolvidas. Elas podem ser classificadas em pré-condicionamento isquêmico (PCI), pós-condicionamento isquêmico (PoCI) e pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) [31].

O PCIR foi descrito por Przyklenk em 1993 [21] em um modelo canino de isquemia miocárdica. Ele demonstrou que o clampeamento intermitente prévio na artéria circunflexa reduziu a área de infarto após a oclusão da artéria descendente anterior. O estudo concluiu que haveria um fator transportável, originado no território da artéria circunflexa, que foi capaz de proteger uma área vascularizada por outra artéria coronária.

A partir deste estudo inicial, diversos pesquisadores demonstraram que o miocárdio poderia ser protegido por estímulos originados da isquemia intermitente em diversos órgãos: rim, intestino delgado[32] e membros[33].

A observação que o PCIR poderia ser aplicado nos membros gerou ainda mais interesse na técnica, já que permitia seu emprego de forma não invasiva, o que a torna facilmente aplicável na prática clínica.

Após a constatação da eficácia da PCIR na proteção miocárdica, diversos estudos demonstraram a sua eficácia em outros órgãos-alvo: SNC [34]; rim [35], [36]; pulmão [37]; trato gastrintestinal [38] e fígado (Tabela 2).

Em todos os estudos publicados que avaliaram o PCIR na I/R hepática o pré-condicionamento foi aplicado na pata dos animais. No entanto diversas técnicas foram empregadas para a indução da isquemia: torniquete [39], banda elástica [40], manguito inflável [22] e clampeamento cirúrgico do pedículo vascular [41] do membro. Neste trabalho optou-se pelo clampeamento vascular, já que é um método simples, reprodutível e que garante a interrupção do fluxo sanguíneo para o membro sem a necessidade do uso de fluxometria Laser Doppler para controle da eficácia da isquemia. Uma preocupação com a aplicação da PCIR no membro era a possibilidade de lesão da inervação da pata, seja durante a dissecação e o

clampeamento dos vasos femorais ou durante a aplicação de compressão externa, atreves de torniquetes e bandas elásticas [42]. Neste estudo todos os animais submetidos a esta técnica não apresentaram alterações motoras identificáveis na pata submetida ao clampeamento, atestando a segurança do procedimento.

Na maioria dos trabalhos publicados, o protocolo de PCIR era composto por três a seis ciclos de I/R do membro variando de cinco a 10 minutos. Em duas publicações foram utilizados apenas um ciclo de I/R de 10 minutos de duração (Tabela 2). Optou-se neste trabalho pela utilização de seis ciclos de I/R com quatro minutos de duração por ser o protocolo empregado nos estudos que demonstraram os resultados mais satisfatórios.

Tabela 2 – Principais estudos sobre PCIR em modelos de I/R hepática

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Espécie</b>	<b>Protocolo RIPC</b>	<b>Protocolo I/R</b>	<b>Endpoint</b>	<b>Proteção</b>
Kanoria et al [22]	2006	Coelho	3 x 10 min isquemia + 10 min reperfusão	25 min isquemia + 2 h de reperfusão	Transaminases, histologia, SaO <sub>2</sub>	Sim
Tapuria et al [39]	2009	Rato	5 x 5 min isquemia + 5 min reperfusão	45 min isquemia + 3 h reperfusão	Microscopia intravital, histologia, transaminases	Sim
Wang et al [40]	2010	Camundongo	10 min isquemia + 10 min reperfusão	60 min isquemia + 4 h de reperfusão	TNF- $\alpha$ , HMGB-1, Transaminases, apoptose	Sim
Abu-Amara et al [43]	2011	Camundongo	6 x 4 min isquemia + 4 min reperfusão	40 min isquemia + 2 h reperfusão	Transaminases, histologia, microcirculação	Sim
Abu-Amara et al [42]	2011	Camundongo	6 x 4 min isquemia + 4 min reperfusão	40 min isquemia + 2 h reperfusão	NO sintase, transaminases, microscopia eletrônica	Sim

Na avaliação histopatológica em modelos experimentais de lesão hepática por I/R podem ser utilizados diversos critérios, como os de Suzuki [39] e de Camargo [42]. Como neste trabalho era fundamental a caracterização e a validação do modelo de PCIR empregado, optou-se pelo Escore Modificado de Injúria Hepática (Tabela 1), já que permite uma caracterização minuciosa das principais alterações histopatológicas encontradas na lesão hepática por I/R.

No presente trabalho foi possível identificar alguns padrões de resposta histopatológica.

Como esperado, houve diferença significativa entre o grupo Sham e os grupos I/R e PCIR em todos os critérios histológicos estudados.

Em relação às lesões celulares reversíveis (balonização, vacuolização citoplasmática, eosinofilia e dissociação hepatocitária) não foi identificada diferença significativa entre os grupos I/R e PCIR.

A infiltração de polimorfonucleares foi bem mais intensa no grupo PCIR quando comparado ao grupo I/R. Mesmo não alcançando significância estatística, estes resultados sugerem uma tendência a uma resposta quimiotóxica mais intensa no grupo PCIR, com significado biológico ainda incerto.

Não houve diferença significativa no critério extravasamento de hemácias entre os grupos I/R e PCIR.

O resultado histopatológico mais relevante foi em relação à necrose celular. No grupo PCIR 3h houve redução significativa da necrose celular quando comparado com o grupo I/R 3h. Fica claro, assim, o papel protetor do PCIR na lesão hepática por I/R. Vale ressaltar a importância da variável tempo de reperfusão na presença de necrose, demonstrado pela diferença entre os grupos I/R 1h e I/R 3h.

Em trabalho que utilizou a metodologia de avaliação histopatológica semelhante à deste estudo [43], os resultados foram bastante similares. As únicas diferenças encontradas foram uma redução significativa da dissociação hepatocitária, da balonização celular e da infiltração mais intensa de polimorfonucleares no Grupo PCIR quando comparado ao grupo I/R.

A dosagem de ALT é um marcador clássico de necrose hepática, sendo empregada em estudos clínicos e experimentais como marcador de injúria hepática. Nos principais estudos que empregaram o PCIR em modelos de lesão hepática por I/R houve redução significativa nos níveis plasmáticos de ALT (Tabela 2). Este estudo reproduziu estes resultados, sendo identificada redução significativa nos



níveis plasmáticos de ALT no grupo PCIR 3-h quando comparado ao grupo I/R 3h, novamente demonstrando o efeito protetor do PCIR na lesão hepática por I/R e corroborando os achados do estudo histopatológico.

Ainda que a eficácia do PCIR tenha sido demonstrada, os mecanismos moleculares responsáveis por seus efeitos ainda não foram esclarecidos. O primeiro evento ocorre no tecido responsável pelo estímulo ao PCIR, onde são gerados os fatores protetores. A segunda etapa se refere à transmissão destes fatores até o órgão-alvo, que pode ser mediada por mecanismos neuronais, por substâncias transportadas pela corrente sanguínea, por resposta sistêmica ou uma combinação destes três mecanismos. Finalmente, a terceira etapa engloba os eventos que ocorrem no órgão-alvo e conferem proteção a este tecido [23].

Acredita-se que as vias de sinalização intracelulares ativadas pelo PCIR, tanto no tecido em que o estímulo é aplicado quanto no órgão-alvo, sejam semelhantes às envolvidas no mecanismo de PCI, sendo os mediadores mais importantes: adenosina, bradicinina, opióides endógenos, angiotensina, NO, radicais livres de oxigênio, Akt, Erk1/2, MAPK e STAT3 e STAT5 [44], [45].

Há controvérsia em relação à etapa intermediária, ou seja, qual a via responsável por levar o estímulo aplicado à distância até o órgão-alvo.

Os autores que defendem a via neuronal como a mais relevante argumentam que o bloqueio na inervação da região onde o PCIR é aplicado, seja através da utilização de bloqueadores ganglionares, como o trimetafam [46], ou a secção neural [47], há perda do efeito protetor no órgão alvo. Esses autores acreditam que o estímulo isquêmico remoto leva à liberação local de adenosina, CGRP e bradicinina, que estimulam as terminações nervosas aferentes onde o estímulo é aplicado e estas, por sua vez, estimulam fibras nervosas eferentes que terminam no órgão-alvo, transmitindo assim o efeito protetor.

Duas linhas de evidência apoiam a hipótese de uma via humoral como explicação para o PCIR. Dickson e colaboradores[48] mostraram que o sangue coletado de um animal que foi submetido ao PCIR foi capaz de reduzir a lesão por I/R outro animal que não tinha sido submetido ao PCIR. Vários pesquisadores[32],[49] identificaram a necessidade de um período de reperfusão do órgão-alvo para que o efeito protetor da PCIR fosse observado, sugerindo que seria necessário que um fator humoral presente na circulação sistêmica alcançasse o órgão-alvo. Várias substâncias foram sugeridas como possíveis mediadores

humorais do PCIR, destacando-se a adenosina, opióides, endocanabinóides, angiotensina-1 e prostanglandinas [23].

Outro mecanismo que explicaria a transmissão do efeito protetor é a resposta sistêmica desencadeada pela isquemia transitória no sítio remoto. Foi demonstrado, através de estudo de expressão gênica com *microarrays*, que a isquemia por um curto período leva à supressão de diversos genes com ação pró-inflamatória, reduzindo a síntese de citocinas, a migração leucocitária e a apoptose; e a ativação de genes anti-inflamatórios como o HSP70[50].

Poucas publicações até agora abordaram possíveis mecanismos de ação do PCIR na lesão hepática [23] e há poucos estudos que caracterizem especificamente o efeito da PCIR na síntese de citocinas.

A ativação do sistema imunológico inato tem papel central na lesão por I/R e um dos seus agentes efetores mais importantes são as citocinas. Elas são responsáveis por induzir uma resposta inflamatória aguda, base da lesão celular por I/R; mas também limitar o dano tecidual, participando dos sinais de *feedback* negativos que regulam a resposta inflamatória; além de estimular a regeneração hepática.

A citocina central neste processo é o TNF- $\alpha$ . Ela é produzida em grandes quantidades tanto na fase de isquemia, quando as CK e as células dendríticas ativadas respondem com a produção TNF- $\alpha$  e outros mediadores da resposta inflamatória aguda, quanto na fase de reperfusão, quando ocorre migração e ativação de linfócitos T CD4+ que passam a produzir não só TNF- $\alpha$  como outras citocinas importantes: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-13.

O TNF- $\alpha$  tem duas ações importantes no tecido hepático. Através da ativação das via das caspases e da via RIP3 induz morte celular através de mecanismos de apoptose ou necroptose, respectivamente. Também é responsável pelo estímulo inicial à regeneração hepática, já que pode também ativar as vias MAPK e NF- $\kappa$ B, que levam à transcrição de fatores responsáveis pela sobrevivência celular e regeneração tecidual [12].

Foi demonstrado em vários estudos que as técnicas de pré-condicionamento isquêmico e de PCIR reduzem os níveis de TNF- $\alpha$ ; e os autores destes trabalhos creditam a esta modulação da síntese de TNF- $\alpha$  parte do efeito protetor do PCI e PCIR nos modelos de lesão hepática por I/R [40, 41]. Neste trabalho, em desacordo como os resultados citados acima, não foi identificada diferença significativa nos

níveis desta citocina entre os grupos estudados. Uma possível explicação para esta discordância seja a meia-vida curta e a labilidade plasmática desta citocina, o que pode ter dificultado sua detecção precisa no presente estudo.

Outra citocina fundamental no processo de lesão hepática por I/R é a IL-6. Da mesma forma que o TNF- $\alpha$ , tem dupla ação: participa da resposta inflamatória aguda desencadeada pelo processo de isquemia e é responsável pelos sinais sistêmicos que acompanham este processo fisiopatológico, como também participa da sinalização inicial do processo de regeneração hepática.

Vários autores estudaram o impacto do PCI na expressão da IL-6 [51-55]. Todos concluíram que a IL-6 tem efeito protetor da lesão por I/R, ainda que o mecanismo exato não tenha sido completamente esclarecido[56]. Em três trabalhos houve dosagem seriada do IL-6 no tecido hepático (mRNA) [51, 54] ou plasmática [52]. Em todos os trabalhos o padrão é semelhante: na fase precoce da reperfusão os valores de IL-6 são maiores no grupo sem pré-condicionamento e ao longo do período de reperfusão (entre três e seis horas) esta situação se inverte, havendo aumento significativo dos valores de IL-6 no grupo submetido ao pré-condicionamento quando comparado ao grupo I/R. Dos três estudos mencionados, apenas um [54] utilizou o PCIR e mesmo assim em um modelo de transplante hepático experimental.

Não foi identificado nenhum trabalho publicado acerca do comportamento plasmático da IL-6 em modelo de PCIR hepático que permitisse a comparação direta com os resultados apresentados no presente trabalho.

Neste modelo experimental o comportamento da IL-6 foi semelhante ao observado nos estudos que empregaram o PCI. Houve redução significativa da IL-6 no grupo PCIR 3h quando comparado ao grupo PCIR 1h, característica da fase precoce da reperfusão (período de tempo observado neste estudo).

A IL-10 é outra citocina central no processo fisiopatológico da I/R hepática. Ela exerce um papel central na regulação negativa do processo inflamatório agudo que acompanha a lesão por I/R [57]. Vários estudos mostraram também a correlação positiva entre a elevação da IL-10 e melhora nos parâmetros inflamatórios hepáticos[58-60].

No presente estudo foi observado que o grupo PCIR 3h apresentou os maiores valores plasmáticos de IL-10, ainda que, quando comparado aos grupos IR 1h e IR 3h, não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa. Estes

resultados sugerem uma tendência de aumento da IL-10 como resultado da aplicação da PCIR. Uma possível dificuldade na confirmação deste aumento foi a limitação do estudo à fase precoce da reperfusão. É provável que estudos posteriores, englobando tanto a fase precoce quanto a tardia tenham poder estatístico para confirmar esta hipótese.

## CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que o modelo de PCIR empregado neste estudo foi capaz de reduzir a necrose hepática em ratos submetidos a lesão por I/R.

A aplicação do PCIR levou a redução significativa dos níveis de IL-6 após três horas de reperfusão quando comparada ao grupo PCIR 1h.

Não houve diferença entre os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 entre os grupos estudados.

## REFERÊNCIAS

1. Hammond JS, Guha IN, Beckingham JJ, Lobo DN. Prediction, prevention and management of postresection liver failure. *The British journal of surgery*. 2011;98(9):1188-200. Epub 2011/07/05.
2. Balzan S, Belghiti J, Farges O, Ogata S, Sauvanet A, Delefosse D, et al. The "50-50 criteria" on postoperative day 5: an accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. *Annals of surgery*. 2005;242(6):824-8, discussion 8-9. Epub 2005/12/06.
3. Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, Garden OJ, Wigmore SJ. The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut*. 2005;54(2):289-96. Epub 2005/01/14.
4. Clavien PA, Oberkofler CE, Raptis DA, Lehmann K, Rickenbacher A, El-Badry AM. What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality? *Hepatology*. 2010;52(2):715-29. Epub 2010/08/05.
5. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *American journal of transplantation*: 2011;11(8):1563-9. Epub 2011/06/15.
6. Lemasters JJ, DiGiuseppi J, Nieminen AL, Herman B. Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. 1987;325(6099):78-81. Epub 1987/01/01.
7. Zahrebelski G, Nieminen AL, al-Ghoul K, Qian T, Herman B, Lemasters JJ. Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes: a laser scanning confocal microscopic study. *Hepatology*. 1995;21(5):1361-72. Epub 1995/05/01.
8. Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundiyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2009;32(1):4-16. Epub 2008/11/15.
9. Wu HS, Zhang JX, Wang L, Tian Y, Wang H, Rotstein O. Toll-like receptor 4 involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *HBPD Int*. 2004;3(2):250-3. Epub 2004/05/13.
10. Bamboat ZM, Ocuin LM, Balachandran VP, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(2):559-69. Epub 2010/01/23.
11. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(2):79-89. Epub 2012/12/12.

12. Shuh M, Bohorquez H, Loss GE, Jr., Cohen AJ. Tumor Necrosis Factor-alpha: Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):119-30. Epub 2013/03/28.
13. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009;16(1):3-11. Epub 2008/10/11.
14. Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, Kunzendorf U, Krautwald S. Programmed necrosis in acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation* 2012;27(9):3412-9. Epub 2012/09/04.
15. Rosenbaum DM, Degtarev A, David J, Rosenbaum PS, Roth S, Grotta JC, et al. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(7):1569-76. Epub 2009/12/22.
16. Oerlemans MI, Koudstaal S, Chamuleau SA, de Kleijn DP, Doevendans PA, Sluijter JP. Targeting cell death in the reperfused heart: pharmacological approaches for cardioprotection. *International journal of cardiology*. 2013;165(3):410-22. Epub 2012/03/31.
17. Tang ZY, Loss G, Carmody I, Cohen AJ. TIMP-3 ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury through inhibition of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme activity in rats. *Transplantation*. 2006;82(11):1518-23. Epub 2006/12/14.
18. Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration. *Journal of autoimmunity*. 2010;34(1):29-37. Epub 2009/09/01.
19. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*. 2011;29:71-109. Epub 2010/12/21.
20. de Rougemont O, Dutkowski P, Clavien PA. Biological modulation of liver ischemia-reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*. 2010;15(2):183-9. Epub 2010/02/04.
21. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-9. Epub 1993/03/01.
22. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *The British journal of surgery*. 2006;93(6):762-8. Epub 2006/04/13.

23. Lim SY, Hausenloy DJ. Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front Physiol.* 2012;3:27. Epub 2012/03/01.
24. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia.* 2009;24(1):69-74. Epub 2009/01/27.
25. Zhou SP, Jiang P, Liu L, Liu H. Protective effect of sevoflurane on hepatic ischaemia/reperfusion injury in the rat: A dose-response study. *European journal of anaesthesiology.* 2013. Epub 2013/05/25.
26. Blakemore AH, Lord JW. The Technic of Using Vitallium Tubes in Establishing Portacaval Shunts for Portal Hypertension. *Annals of surgery.* 1945;122(4):476-89. Epub 1945/10/01.
27. Spiegel HU, Bremer C, Boin C, Langer M. Reduction of hepatic reperfusion injury by indomethacin-mediated vasoconstriction: a rat model with temporary splenocaval shunt. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research.* 1995;8(5):363-9. Epub 1995/09/01.
28. Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, Mitsuoka H, Tsuchiya Y, Kojima Y, et al. Pathophysiological appraisal of a rat model of total hepatic ischemia with an extracorporeal portosystemic shunt. *The Journal of surgical research.* 1998;80(1):22-7. Epub 1998/10/29.
29. Yamauchi H, Baca I, Mittmann U, Geisen HP, Salzer M. Postischemic liver damage in rats: effect of some therapeutic interventions on survival rate. *The Tohoku journal of experimental medicine.* 1982;138(1):63-70. Epub 1982/09/01.
30. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2011;26 Suppl 1:180-7. Epub 2011/01/14.
31. Selzner N, Boehnert M, Selzner M. Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transplant Rev (Orlando).* 2012;26(2):115-24. Epub 2011/10/18.
32. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation.* 1996;94(9):2193-200. Epub 1996/11/01.
33. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation.* 1997;96(5):1641-6. Epub 1997/10/07.
34. Jensen HA, Loukogeorgakis S, Yannopoulos F, Rimpilainen E, Petzold A, Tuominen H, et al. Remote ischemic preconditioning protects the brain against




- injury after hypothermic circulatory arrest. *Circulation*. 2011;123(7):714-21. Epub 2011/02/09.
35. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002;74(9):1247-51. Epub 2002/11/27.
  36. Lazaris AM, Maheras AN, Vasdekis SN, Karkaletsis KG, Charalambopoulos A, Kakisis JD, et al. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach. *The Journal of surgical research*. 2009;154(2):267-73. Epub 2009/04/21.
  37. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology*. 2001;33(1):100-13. Epub 2000/12/22.
  38. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik M, et al. Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *European journal of pharmacology*. 2004;499(1-2):201-13. Epub 2004/09/15.
  39. Tapuria N, Junnarkar SP, Dutt N, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of hepatic ischemia reperfusion injury. *HPB*. 2009;11(2):108-17. Epub 2009/07/11.
  40. Wang F, Birch SE, He R, Tawadros P, Szaszi K, Kapus A, et al. Remote ischemic preconditioning by hindlimb occlusion prevents liver ischemic/reperfusion injury: the role of High Mobility Group-Box 1. *Annals of surgery*. 2010;251(2):292-9. Epub 2009/10/28.
  41. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver transplantation*. 2010;16(9):1016-32. Epub 2010/09/08.
  42. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Fuller B, Seifalian A, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in remote ischemic preconditioning of the mouse liver. *Liver transplantation*. 2011;17(5):610-9. Epub 2011/04/21.
  43. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Tapuria N, Seifalian AM, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on liver ischemia/reperfusion injury using a new mouse model. *Liver transplantation*. 2011;17(1):70-82. Epub 2011/01/22.
  44. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):334-41. Epub 2008/12/17.


45. Heusch G, Musiolik J, Kottenberg E, Peters J, Jakob H, Thielmann M. STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication. *Circulation research*. 2012;110(1):111-5. Epub 2011/11/26.
46. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(3):450-6. Epub 2005/08/02.
47. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic research in cardiology*. 2010;105(5):651-5. Epub 2010/05/08.
48. Dickson E, Reinhardt C, Renzi F, Becker R, Porcaro W, Heard S. Ischemic Preconditioning May Be Transferable via Whole Blood Transfusion: Preliminary Evidence. *J Thromb Thrombolysis*. 1999;8(2):123-9.
49. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovascular research*. 2002;55(3):590-601. Epub 2002/08/06.
50. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiological genomics*. 2004;19(1):143-50. Epub 2004/08/12.
51. Teoh N, Field J, Farrell G. Interleukin-6 is a key mediator of the hepatoprotective and pro-proliferative effects of ischaemic preconditioning in mice. *Journal of hepatology*. 2006;45(1):20-7. Epub 2006/04/08.
52. Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, Burger C, McAuliffe PF, Scumpia PO, et al. Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery*. 2006;140(5):793-802. Epub 2006/11/07.
53. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. 1997;26(6):1513-20. Epub 1997/12/16.
54. Wang M, Shen J, Feng B, Gui L, Chen Q, Zhang B, et al. Remote ischemic preconditioning promotes early liver cell proliferation in a rat model of small-for-size liver transplantation. *The Journal of surgical research*. 2013;179(1):e245-53. Epub 2012/04/11.

55. Tiberio L, Tiberio GA, Bardella L, Cervi E, Cerea K, Dreano M, et al. Mechanisms of interleukin-6 protection against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Cytokine*. 2006;34(3-4):131-42. Epub 2006/07/04.
56. Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, et al. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):989-98. Epub 2003/10/03.
57. Ji H, Shen X, Gao F, Ke B, Freitas MC, Uchida Y, et al. Programmed death-1/B7-H1 negative costimulation protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. 2010;52(4):1380-9. Epub 2010/09/04.
58. Ke B, Shen XD, Tsuchihashi S, Gao F, Araujo JA, Busuttil RW, et al. Viral interleukin-10 gene transfer prevents liver ischemia-reperfusion injury: Toll-like receptor-4 and heme oxygenase-1 signaling in innate and adaptive immunity. *Human gene therapy*. 2007;18(4):355-66. Epub 2007/04/19.
59. Dinant S, Vetelainen RL, Florquin S, van Vliet AK, van Gulik TM. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *The Journal of surgical research*. 2007;141(2):176-82. Epub 2007/06/05.
60. Yagihashi A, Hirata K, Zou XM, Tsuruma T, Araya J, Yajima T, et al. Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractants and reduction of reperfusion injury in liver allograft by interleukin-10. *Transplantation proceedings*. 2000;32(7):2302. Epub 2000/12/20.

**ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ**



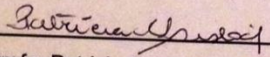
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

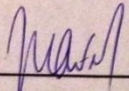


**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**  
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/035/2011** sobre "**Avaliação da resposta inflamatória em ratos submetidos à pré-condicionamento isquêmico remoto hepático através de dosagem de TNF-alfa, IL-6 e IL-10**", sob a responsabilidade de **Marcos Bettini Pitombo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **14/07/2011**. Este certificado expira em **14/07/2015**.

Rio de Janeiro, 14 de Julho de 2011.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Israel Feizenzwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

Prof<sup>ª</sup> Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Prof<sup>ª</sup> Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas - IBRAG / UERJ  
Matricula 34765-8

Israel Feizenzwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Mat. 2887-8

/ass

(21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br