



RODOLFO DOS REIS TÁRTARO

**O CLAMPEAMENTO TOTAL INTERMITENTE DO
PEDÍCULO HEPÁTICO POR LONGO TEMPO, EM RATO
WISTAR, NÃO EXERCE FUNÇÃO PROTETORA**

***THERE WAS NO PROTECTIVE FUNCTION IN WISTAR
RATS SUBMITTED TO LONG ISCHEMIA TIME AND
REPERFUSION AFTER INTERMITTENT CLAMPING OF
THE TOTAL HEPATIC PEDICLE***

**CAMPINAS
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

RODOLFO DOS REIS TÁRTARO

**O CLAMPEAMENTO TOTAL INTERMITENTE DO
PEDÍCULO HEPÁTICO POR LONGO TEMPO, EM RATO
WISTAR, NÃO EXERCE FUNÇÃO PROTETORA**

***THERE WAS NO PROTECTIVE FUNCTION IN WISTAR
RATS SUBMITTED TO LONG ISCHEMIA TIME AND
REPERFUSION AFTER INTERMITTENT CLAMPING OF
THE TOTAL HEPATIC PEDICLE***

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de **Mestre** em Ciências.

Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP, as part of the requisite criteria for obtaining the title of **Master** in Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO RODOLFO DOS REIS
TÁRTARO, E ORIENTADO PELA PROF^a. DR^a. ILKA DE FÁTIMA
SANTANA FERREIRA BOIN.

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS,
2015**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T178c Tártaro, Rodolfo dos Reis, 1984-
O clampeamento total intermitente do pedículo
hepático por longo tempo, em ratos Wistar, não exerce
função protetora / Rodolfo dos Reis Tártaro. – Campinas,
SP : [s.n.], 2015.

Orientador : Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Constrição. 2. Isquemia. 3. Reperusão. 4. Ratos
Wistar. 5. Mitocôndrias. I. Boin, Ilka de Fátima Santana
Ferreira, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: There was no protective function in Wistar rats submitted to long ischemia time and reperfusion after intermittent clamping of the total hepatic pedicle

Palavras-chave em inglês:

Constriction

Ischemia

Reperfusion

Rats, Wistar

Mitochondria

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin [Orientador]

Wellington Andraus

Edmyr Rosa dos Reis

Data de defesa: 27-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RODOLFO DOS REIS TÁRTARO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN

2. PROF(A). DR(A). WELLINGTON ANDRAUS

3. PROF(A). DR(A). EDMYR ROSA DOS REIS

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de fevereiro de 2015

RESUMO

Introdução: A manobra de Pringle intermitente é utilizada para a grande cirurgia de transplante, traumas e proteção hepática, mas o longo tempo de isquemia e reperfusão podem limitar a proteção em ratos Wistar. **Objetivo:** Comparar as alterações mitocondriais hepáticas, após clampeamento total intermitente versus o clampeamento contínuo do pedículo hepático por período de 40 minutos em ratos Wistar. **Método:** Quarenta e dois ratos Wistar machos, peso de $327,7 \pm 51,75\text{g}$, foram anestesiados com tiopental sódico (iv), com incisão em U no abdome. O pedículo hepático foi isolado e clampeado. Os animais foram distribuídos em três grupos: Grupo Contínuo (GC, n=14, submetidos a 40 minutos isquemia/40 minutos reperfusão). Grupo Intermitente (GI, n=14, submetidos a quatro ciclos de 10 minutos isquemia/10 minutos reperfusão). Grupo Controle (GCL, n=14, submetido a laparotomia por 80 minutos). No final do experimento, realizou-se coleta de sangue para dosagens das transaminases (AST/ALT) e biopsias hepáticas para avaliação da respiração mitocondrial e avaliação histológica. **Resultados:** GC e GI apresentaram AST/ALT elevadas ($p<0,008$) quando comparados ao GCL; as mitocôndrias estimuladas por ADP ou FCCP tiveram redução da respiração ($p<0,05$) e redução na razão do controle respiratório nos grupos (GC e GI) isquêmicos ($p<0,03$), quando comparados ao GCL, embora a comparação entre GI e GC não tenha apresentado diferença em relação à respiração mitocondrial. Na avaliação histológica: GC apresentou 33% necrose hemorrágica focal, 17% congestão sinusoidal e/ou vacuolização e 50% congestão venosa; GI teve 43% congestão sinusoidal e/ou vacuolização e 57% congestão venosa. **Conclusão:** As lesões hepáticas e alterações da respiração mitocondrial, após longo tempo de isquemia e reperfusão, aconteceram, independente do tipo de clampeamento utilizado, sendo que o grupo intermitente não se mostrou efetivo em evitar estas alterações.

Palavra chave: Constrição, Isquemia, Reperfusão, Ratos Wistar, Mitocôndrias.

ABSTRACT

Introduction: The intermittent Pringle maneuver is utilized for major transplant surgery, traumas and hepatic protection, but long ischemia time and reperfusion may limit some protection in Wistar rats. **Aim:** Evaluate the protection effects of intermittent clamping in the total hepatic pedicle, after a long period of ischemia and reperfusion in Wistar rats. **Method:** Forty-two male Wistar rats, weighing $\pm 327,7g$, anesthetized with sodium thiopental (iv) and subjected to a U-shaped incision in the abdomen. The total hepatic pedicle was isolated and subjected to a clamping with a microvascular clamp. Continuous Group (CG, n=14, 40 minutes of ischemia/40 minutes of reperfusion). Intermittent Group (IG, n=14, 4 cycles a 10 minute ischemia/reperfusion 10 minutes). Sham Group (SG, n=14, 80 minute observation time). Blood collection the dosage of transaminases and hepatic biopsies for evaluation of mitochondrial respiration and histological evaluation. **Results:** In groups CG and IG, AST and ALT enzymes were elevated in comparison to group SG ($p<0,008$); mitochondrias when stimulated by ADP or FCCP had a significant decrease in breathing ($p<0.05$), and the respiratory control ratio (RCR) in the ischemic groups was lower ($p<0.03$) when compared to the GS. In histology GC 100% had lesions: 33% focal hemorrhagic necrosis, 17% sinuzoidal congestion and/or vacuolization and 50% venous congestion, in GI 100% had lesions: 43% sinuzoidal congestion and/or vacuolization, 57% venous congestion. **Conclusion:** The intermittent total hepatic pedicle clamping for a long time in the Wistar rats was not effective in the protection of liver injury.

Keywords: Constriction, Ischemia, Reperfusion, Rats – Wistar, Mitochondria.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELA.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO	18
CAPÍTULO.....	19
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	53
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética.....	53
Anexo 2 – Submissão do manuscrito a Transplantation Proceedings.....	54
Anexo 3 – Aceito para publicação em Transplantation Proceedings.....	56
Anexo 4 – Direitos autorais.....	58
Anexo 5 – Certificados de Apresentação em Congressos Internacionais	59
Anexo 6 – Normas da redação da Dissertação	61
Anexo 7 – Gráficos de respiração mitocondrial em biopsia hepática dos grupos GCL, GI e GC representado respectivamente A, B e C.....	62

DEDICATÓRIA

*À minha família, por me apoiar, fazendo com que eu acreditasse,
tornando, assim, este sonho possível:*

*Paulo Tártaro,
Zenaide dos Reis Tártaro,
Camila dos Reis Tártaro Ishibashi,
Marcio Yoshio Ishibashi,
Eleonora Tártaro Ishibashi
e ao João Paulo Tártaro Ishibashi.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus que iluminou e me encaminhou durante toda a minha jornada.

Aos meus pais, Paulo Tártaro e Zenaide dos Reis Tártaro que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minha irmã, Camila dos Reis Tártaro, e ao meu cunhado, Márcio Yoshio Ishibashi, que me deram uma grande oportunidade de estudar, sonhar e poder concretizar mais esta etapa.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, por abrir as portas do laboratório de Transplante Hepático - NMCE durante minha graduação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, por acreditar em meus esforços, pela atenção, carinho e por me guiar durante esta construção de conhecimento.

À biomédica Gracinda de Lourdes Jorge, pela preciosa amizade, incentivo, e por ter me conduzido ao fascinante universo da pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugenio Vercesi, que abriu as portas do laboratório de Bioenergética - NMCE e acreditou em nosso trabalho.

À Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, pela assessoria e avaliação histológica.

À farmacêutica bioquímica, Ana Cândida Coutinho Facin, pela contribuição na avaliação bioquímica.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze e Rosana Trevisan do laboratório de Anatomia Patológica Experimental do NMCE, pela amizade, incentivo e contribuição na confecção das lâminas para avaliação histopatológica.

À Laura de Brito Évora, que vem participando de toda esta trajetória me dando carinho, apoio, sorrisos, amizade e me deixando confiante.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e à operacionalização do estudo.

Aos meus irmãos de república, que me apoiaram sempre com suas brincadeiras e alegria.

Ao meu irmão, Leopoldo dos Reis Tártaro, (in memoriam) por me dar bons exemplos, sempre me aconselhar, me mostrar que devemos lutar por aquilo que acreditamos e sempre demonstrar seu grande amor e carinho.

Ao Paolo Gadioli La Guardia, (in memoriam) por me ensinar com muita paciência, durante meus primeiros passos no campo novo da bioquímica, e demonstrar sua amizade e carinho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	A - Velocidade de respiração mitocondrial em biópsia de fígado	
	B - Razão do controle respiratório (ADP/oligomicina)	
	C - Razão do controle respiratório (FCCP/oligomicina)	32
Figura 2:	A - Avaliação histológica com congestão sinusoidal e vacuolização.	
	B - Avaliação histológica com congestão sinusoidal intensa.	
	C - Avaliação histológica com congestão sinusoidal difusa e área de necrose hemorrágica central	33

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Teste do perfil hepático e alterações histológicas observadas no grupo controle (GCL), no grupo contínuo (GC) e no grupo intermitente (GI)	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GCL	– Grupo controle / SG – Sham group
GI	– Grupo intermitente / IG – Intermittent group
GC	– Grupo Contínuo / CG – Continuos group
AST	– Aspartato aminotransferase / aspartate aminotransferase
ALT	– Alanina aminotrasferase / alanine aminotransferase
ADP	– Adenosina difosfato /adenosine diphosphate
FCCP	– carbonylcyanide p-trifluormetoxifenilidrazona / carbonylcyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
HE	– Hematoxilina eosina / Hematoxylin eosin
ROS	– Espécie reativa de oxigênio
O₂	– Oxigênio
O₂•-	– Radical superóxido
OH.	– Radical hidroxila reativo
H₂O	– Água
H₂O₂	– Peróxido de hidrogênio
Fe²⁺	– Ferro
TPM	– Transição de permeabilidade mitocondrial
HEPES	– (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N' –[2-ethanesulfonic acid])
RCR	– Razão do controle respiratório
DDT	– Dithiothreitol
Unicamp	– Universidade Estadual de Campinas
LAP	– Laboratório de Anatomia Patológica

HC	– Hospital das Clínicas
CEUA	– Comitê de Ética de Uso de animais
ECAU	– Ethics Committee on Animal Use
NMCE	– Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
CEMIB	– Centro Multidisciplinar para Investigação na Área da Ciências em Animais de Laboratório
iv	– Intra venonso
g	– grama
mg	– miligrama
L	– litro
ml	– mililitro
μL	– microlitro
mM	– milimol
SP	– São Paulo
RJ	– Rio de Janeiro

INTRODUÇÃO

A Isquemia e a reperfusão (I/R), são procedimentos muitas vezes necessários para controle de hemorragias em transplantes e traumas hepáticos¹⁻⁷.

A manobra idealizada por Pringle, em 1908, como forma de prevenção e tratamento de sangramentos⁷⁻⁸, tem sido utilizada pelos cirurgiões para a obtenção de exclusão vascular hepática, sendo empregada durante ferimentos hepáticos, ressecções hepáticas e nos transplantes hepáticos⁹⁻¹².

É notório que tanto a isquemia das vias biliares, quanto o sangramento excessivo, interferem diretamente na morbidade e mortalidade operatórias em ressecções hepáticas^{9,10}, assim como no transplante de fígado¹³.

Estudos demonstram que nos órgãos submetidos à isquemia hepática, seguidos de reperfusão, ocorre o desenvolvimento de lesões de isquemia-reperfusão¹⁴⁻¹⁷.

Essa lesão envolve uma complexa cascata de eventos que engloba as alterações enzimáticas, perda de energia, o desequilíbrio da hemostasia iônica, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a morte celular^{14,18-24}.

As alterações enzimáticas que são observadas logo após o procedimento cirúrgico, ou durante o pós-cirúrgico, são consequências da hipóxia sofrida pelo órgão e da reperfusão do parênquima remanescente²⁵.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) pode ser encontrada no fígado, miocárdio, músculo esquelético, pâncreas e rins. Qualquer dano celular nestes tecidos resulta em uma elevação dos níveis séricos²⁶.

A enzima alanina aminotransferase (ALT) é mais utilizada para a avaliação hepática, pois os níveis hepáticos excedem a concentração miocárdica. Sua elevação está correlacionada ao dano hepatocelular agudo²⁶.

Estas enzimas em concentrações elevadas são bons marcadores de lesões hepáticas, sendo utilizadas, também, na prática clínica para acompanhamentos dos doentes e nas alterações da permeabilidade da membrana plasmática²⁷⁻²⁹. Alguns trabalhos demonstram que a elevação de seus níveis depende do tempo de reperfusão^{30,31}.

A perda de energia do órgão, gerada com a isquemia, leva a um metabolismo anaeróbico, reduzindo a produção de adenosina trifosfato (ATP), levando ao aumento da produção de hipoxantina, que é formada a partir de redução de xantina, aumentando o influxo de cálcio, lise das proteínas estruturais e das membranas, maior permeabilidade da membrana mitocondrial e alterações no sistema de fosforilação oxidativa³²⁻³⁵.

Quando há depleção de ATP por anóxia ocorre a falta de energia, produzindo falhas na bomba de sódio (Na) e potássio (K), que está localizada na membrana celular, acarretando a entrada de Na e água, para o meio intracelular e saída de K, para o meio extracelular, produzindo edema intracelular³⁶⁻³⁸.

Nesse caso, ocorre acidose intracelular em decorrência da diminuição de ATP que é provocada pela glicólise anaeróbica e consequente acúmulo de ácido láctico³⁹.

A diminuição do pH intracelular inicial, em níveis moderados, parece funcionar como citoprotetor por inibir a ação das hidrolases^{40,41}.

A duração da isquemia está diretamente relacionada à depleção de ATP, mas um dos fatores determinantes da viabilidade da função do órgão é a velocidade de restauração da oxigenação, após a reperfusão^{42,43}. O meio ácido exacerbado não é favorável para a cinética normal das enzimas, privando a célula dos seus mecanismos para manutenção da homeostase²⁷.

A oferta de energia é restaurada e os metabólitos tóxicos são removidos com consequências positivas na reperfusão. Podem provocar distúrbios metabólicos e lesão do tecido, em razão do retorno de sangue ser rico em potássio e com pH ácido para a circulação sistêmica^{23,44}.

A isquemia ocasiona a perda dos mecanismos de homeostasia intracelular os quais dependem de energia; essa perda do gradiente osmótico, por falhas da bomba iônica de Na e K, leva à inativação de proteínas e oxidação dos grupos tióis³⁷.

A inibição das enzimas $\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ e $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}/\text{ATPase}$, determina edema celular e formação de vesículas, alterando a estrutura da microcirculação. O cálcio leva à disfunção da membrana mitocondrial e lesão irreversível^{37,38}.

A estas alterações segue-se autólise secundária à isquemia (edema dos lisossomos, vacuolização do retículo endoplasmático, vazamento de enzimas e

proteínas, e descaracterização da compartimentalização celular). A integridade das membranas não pode ser mantida, ocorrendo a morte celular^{35,36}.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é consequência da passagem de elétrons pela cadeia respiratória.

Aproximadamente 2% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não são utilizados para reduzir oxigênio (O_2) à água (H_2O)⁴⁷. Esses elétrons se combinam com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, principalmente nos complexos respiratórios I e III, promovendo a redução mono eletrônica do oxigênio, gerando, assim, o radical superóxido ($O_2 \bullet^-$)^{44,45,46}.

Distúrbios microcirculatórios associados à isquemia e reperfusão são efeitos do desequilíbrio entre o óxido nítrico (NO) e a produção de endotelina. Concomitantemente ocorre a ativação de células de Küpffer, liberando espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina. A ROS também pode ser derivada das mitocôndrias^{24,47}.

As citocinas, promovem a ativação de neutrófilos e acumulação, contribuindo para progressão da lesão do parênquima, liberando ROS e proteases^{13,16}.

Estes radicais livres de oxigênio, com número ímpar de elétrons, são altamente reativos; as lesões secundárias a I/R são causadas por estes radicais citotóxicos após a isquemia e reperfusão⁴⁸⁻⁵².

Uma série de alterações no órgão isquêmico promove, na presença destes radicais livres de oxigênio, alterações sistêmicas tais como falência renal e depressão cárdio-circulatória^{35,53-56}.

As mitocôndrias possuem um sistema de defesa antioxidante que dismuta o radical superóxido ($O_2 \bullet^-$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo que este é altamente permeável pelas membranas biológicas, podendo ser removido por antioxidantes⁵³⁻⁵⁷.

O H_2O_2 pode gerar radical hidroxila reativo ($HO\bullet$) que é altamente reativo e citotóxico, sendo que a maior parte do $HO\bullet$ gerado, *in vivo*, provém da reação descrita a seguir, denominada reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} = HO\bullet + HO^- + Fe^{3+}$)⁵⁸.

As espécies reativas de oxigênio geradas na mitocôndria podem oxidar macromoléculas, tanto na própria organela, como em outros sítios intracelulares⁵⁷.

Proteínas, principalmente da membrana mitocondrial interna, são alvos primários de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio⁵⁷.

Esses danos envolvem a formação de grupos carbonila e a oxidação de grupos tióis. Este último pode levar à permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), tornando-a, gradativamente, permeável a prótons, íons, suporte osmótico e pequenas proteínas⁵⁹.

Os complexos das cadeias transportadoras de elétrons (CTE) mitocondriais acabam sofrendo alterações após sofrerem isquemia, diminuindo a eficácia do sistema antioxidante fisiológico⁵⁷.

Curtos períodos de hipóxia aumentam a eletronegatividade dos complexos da CTE, levando ao vazamento de elétrons⁵⁷.

Se o episódio de isquemia for curto, ele pode não ser suficiente para alterar o sistema de antioxidantes na mitocôndria, e a ROS produzida após a reintrodução de O₂ serve como um sistema de defesa^{60,61}.

Nesse contexto, com a geração de radicais livres e a atividade respiratória mitocondrial — em que se observam bons parâmetros para se avaliar a lesão de isquemia e reperfusão hepática — a mitocôndria tem papel crítico, uma vez que passa por grandes mudanças que podem contribuir para o prejuízo do órgão durante o fenômeno de isquemia-reperfusão¹⁸.

A reperfusão do tecido hepático isquêmico está associada a distúrbios circulatórios sistêmicos, aumento da permeabilidade vascular, com edema e desarranjo estrutural hepatocelular, perda da viabilidade do endotélio dos sinusóides e ativação das células de Küpffer e neutrófilos podendo, na dependência do tempo de isquemia, causar morte celular^{18,27,62}.

Distúrbio da microcirculação, aderência de leucócitos e plaquetas, com conseqüente diminuição do fluxo sanguíneo e manutenção do processo de isquemia ocorrem pela perda da viabilidade do endotélio^{63,64}.

Após ativação das células de Küpffer e leucócitos ocorre a liberação de radicais livres de oxigênio, óxido nítrico, além de outros mediadores pró-inflamatórios que, provavelmente, intensificam a lesão do enxerto^{63,64}.

Com o reestabelecimento da perfusão ocorre a restauração da oferta de energia e a remoção dos metabólitos tóxicos. No entanto, a própria perfusão também gera graves consequências metabólicas e maior lesão tecidual que a causada pela isquemia⁶².

A perfusão acarreta efeitos metabólicos sistêmicos em razão do retorno de sangue com pH ácido e rico em potássio para a circulação sistêmica⁶².

A morte celular programada, ou apoptose, é um evento celular fisiológico destinado a controlar o *turnover* celular e a homeostasia celular⁵⁹.

O aumento da morte celular por apoptose em condições como isquemia e perfusão pode contribuir para o desenvolvimento da falência do órgão⁵⁹.

A apoptose inicia-se pela ativação de uma cascata de proteínas intracelulares caspases, e pode ser inibida por proteínas da família Bcl-2. Existe um consenso geral de que as mitocôndrias estejam envolvidas na apoptose através do aumento da permeabilidade de suas membranas, um processo descrito como transição de permeabilidade^{16,65}.

O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna pode ocorrer pela formação de poros não específicos, denominados *megachannels*, no local de contato entre a membrana mitocondrial interna e externa. Acredita-se que estes

megachannels são formados pela interação do translocador do nucleotídeo adenina, do canal de ânions dependentes de voltagem, bem como por outras proteínas, tais como os membros da família Bcl-2¹⁶.

Com a abertura dos poros, a água e pequenas moléculas passam pela membrana, o que pode resultar em inchaço da matriz e ruptura da membrana mitocondrial externa⁶⁵.

O resultado final é a liberação de fatores ativadores como o fator indução de apoptose, o citocromo c e o anticorpo policlonal, que normalmente são mantidos no espaço inter-membranas da mitocondria^{65,66}.

Uma vez liberadas no citosol, estas proteínas induzem a apoptose por contribuir para a ativação de caspases (no caso de citocromo c) ou em uma via independente de caspases^{65,66}.

Durante a isquemia e reperfusão ocorre a transição de permeabilidade mitocondrial, provocada por condições tais como a maior produção de ROS, esgotamento do sistema de antioxidantes, alteração das taxas de nucleotídeo piridina, oscilação da concentração de íons Ca^{2+} e aumento de fosfato inorgânico na matriz mitocôndria^{65,66}.

Estes agravantes ainda não solucionados aumentam a quantidade de pesquisas relacionadas à isquemia e reperfusão hepática, através da isquemia por curto ou longo período, e todas têm demonstrado sérias complicações causadas por lesões secundárias à isquemia e reperfusão^{18,27,30,67-73}.

O mapeamento das mitocôndrias vem sendo estudado desde 1961⁷³, sendo que os estudos das mitocôndrias e suas lesões vem sendo estudado, nas últimas décadas, através de mitocôndrias isoladas ou diretamente em biópsias, avaliando a respiração mitocondrial e sua cadeia transportadora de elétrons em diversos órgãos como: fígado, coração, músculo esquelético, rins e cérebro^{57,74-81}.

A avaliação das mitocôndrias, diretamente no tecido hepático, é importante por evitar possíveis danos na estrutura mitocondrial, como o rompimento da rede tridimensional ou estrutural, o qual pode inibir a atividade das funções vitais ou produzir danos à sua estrutura — como a rede tubular irregular — induzido pela homogeneização mecânica, perda de proteínas solúveis e de outras moléculas da matriz mitocondrial, além de degradação de proteínas da matriz mitocondrial pela ação insidiosa de isolamento, presentes no tampão^{46,58,59}.

Com o uso de um oxígrafo de grande resolução de respirometria é possível a avaliação, sem causar possíveis lesões por efeitos mecânicos, ou químicos, das estruturas mitocondriais^{58,59,82-84}.

A fosforilação oxidativa é uma via metabólica que utiliza a energia liberada de reações de oxidação-redução que ocorrem na membrana interna da mitocôndria, fosforilando o ADP em ATP^{18,57}.

O complexo I é a primeira proteína da CTE, ocorrendo a redução da coenzima ubiquinona, gerando um gradiente de prótons que transfere prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar¹⁸.

O complexo III, estado ativado, reduz a coenzima ubiquinona a ubiquinol no lado interno da membrana mitocondrial e oxida a ubiquinona na região intermembranar, contribuindo para o gradiente de prótons, representando a capacidade de fosforilação mitocondrial e, conseqüente produção de energia (fosforilação do ADP em ATP)¹⁸.

Já no complexo IV, estado basal, ocorre a reação final da CTE, oxidando o citocromo c e transferindo elétrons para o oxigênio, transportando prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, contribuindo com o gradiente de prótons, responsável pela geração e manutenção do potencial de membrana mitocondrial, o qual está relacionado com a integridade da membrana mitocondrial¹⁸.

O aumento da TPM pode gerar a disfunção mitocondrial, observada através da inibição da respiração mitocondrial nos complexos I, III e IV na cadeia respiratória. E pode, também, propiciar a diminuição da razão do controle respiratório (RCR), que é a razão entre (o estado estimulado III pelo estado de repouso IV), medido em mitocôndrias isoladas e diretamente em biópsias, após períodos variados de I/R^{18,27,44-46,57,67,81,85-91}.

Estudos da avaliação da respiração mitocondrial demonstram que o complexo III da CTE, quando estimulado por ADP, aumenta a velocidade do consumo de oxigênio^{18,57,67,81}.

A utilização de oligomicina leva a respiração mitocondrial ao estado de repouso (basal); estudos com potencial de membrana, em grupos isquêmicos e controle,

mostram que em períodos inferiores a uma hora de isquemia não ocorrem alterações de seus valores no transporte de elétrons pela CTE, e mantém valores constantes na velocidade do consumo de oxigênio em relação a grupos não isquêmicos^{18,57}.

O carbonylcyanide p-trifluormetoxifenilidrazona (FCCP), é um desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, interrompendo a síntese de ATP por transportar prótons através da membrana mitocondrial interna, despolarizando o potencial de membrana mitocondrial⁵⁷, estudo demonstra inibição da respiração com diminuição na velocidade de consumo de oxigênio, quando estimulado com FCCP⁵⁷.

A I/R leva a uma inibição da produção de energia mitocondrial, e reduz a velocidade do consumo de oxigênio do estado estimulado^{18,67,81}.

Estudos da avaliação da respiração mitocondrial demonstram que após a I/R prolongada ocorre a redução do estado III e diminuição do RCR^{67,81}; assim, foi relatado que I/R parcial de 40 minutos levou a diminuição da RCR em análise de mitocôndria isolada⁹². Ainda não se tem, na literatura, estudo utilizando um oxígrafo de grande resolução de respirometria, avaliando a respiração diretamente em biópsias de fígado, após I/R intermitente de 40 minutos do pedículo hepático em ratos Wistar.

Diferentes tipos de células estão presentes no fígado, tais como: os hepatócitos, as células de Küpffer, as células endoteliais sinusoidais e as células dos ductos biliares, sendo estas suscetíveis a diferentes tipos de lesões induzidas pela isquemia e reperfusão, durante as cirurgias hepáticas^{18,67}.

Na isquemia normotérmica pode ocorrer vacuolização citoplasmática, congestão sinusoidal e, dependendo do tempo de isquemia, focos de necrose e infiltração gordurosa^{67,93}.

Já isquemia hipotérmica pode apresentar edema celular e ruptura das células sinusoidais, mesmo com a morfologia hepatocelular aparentemente normal^{18,67,94}.

No fígado, a lesão de isquemia e reperfusão pode ser causada por choque hemorrágico, ressecção de grandes tumores, sepse tardia em cirurgias de grandes traumas e transplante hepático²⁷.

No entanto, há que se considerar muitas estratégias para tentar diminuir as lesões secundárias a este procedimento, incluindo manobras cirúrgicas com clampeamento contínuo ou intercalado; pré-condicionamento com tempos menores de isquemia e reperfusão antes de períodos maiores de oclusão; drogas protetoras; clampeamento total ou parcial; aplicação de laser; estratégias estas sempre com o propósito de melhorar a qualidade de sobrevivência do doente^{1,2,19,27,30,62,67-73,95-98}.

O clampeamento intermitente do pedículo hepático é uma das opções cirúrgicas usada na rotina dos cirurgiões em intervenções com longa duração, em que se intercalam períodos de isquemia com reperfusão, evitando um tempo longo de hipóxia ao órgão⁹⁹⁻¹⁰¹.

No estudo, ao se comparar a lesão hepatocelular em ratos, ocasionada pelo emprego do pré-condicionamento isquêmico e de duas outras modalidades de clampeamento da tríade portal como o clampeamento contínuo e o intermitente,

demonstrou-se que o pré-condicionamento se compara ao clampeamento intermitente e provoca menos lesão hepática quando comparado ao clampeamento contínuo¹⁰².

Algumas pesquisas demonstram resultados negativos da proteção do órgão durante a manobra de Pringle intermitente^{93,103,104}. Estudo feito com pós-operatório de seis horas, onde o clampeamento do pedículo hepático foi de 30 minutos em um dos grupos, e no outro, de tempos intercalados de 15 minutos⁹³, os autores relataram que não obtiveram resultados de sobrevivência dos animais, após seis horas de observação com o modelo experimental de I/R hepática normotérmica, utilizando a manobra de Pringle; assim, concluíram que o modelo foi inviável para ratos⁹³.

Outra técnica é o pré-condicionamento, em que se inicia com uma isquemia e reperfusão mais curta, em relação ao próximo tempo de isquemia mais prolongado¹⁰².

O papel do pré-condicionamento isquêmico, como protetor hepático nas oclusões vasculares, tem levado a grandes debates sobre o seu efeito na isquemia e reperfusão por longo período^{27,62,67-70,95-97}.

Ambas as técnicas surgiram com o propósito de diminuir o grau de lesões hepáticas em períodos comparáveis à técnica de clampeamento contínuo.

No entanto, em estudos clínicos vêm sendo demonstrado que para cirurgias prolongadas, ou doenças hepáticas graves, a isquemia e reperfusão intermitente

vem se mostrando mais eficiente, reduzindo a perda de sangue e lesões hepáticas pós-cirúrgicas, em comparação à técnica contínua^{28,29,105}.

Entretanto, estes achados são muito discutidos, pois também foi demonstrado que a relação entre as técnicas intermitente e contínua se mostram semelhantes, após longos períodos de I/R^{93,106,107}, levando-se em conta o tempo de duração, a lesão existente no órgão, a presença de esteatose e o tempo de reperfusão^{108,109}.

Como protetor hepático, é importante avaliar, no tecido hepático do rato, a isquemia intermitente após um longo período de isquemia.

Outra alternativa de estudo é a isquemia e reperfusão parcial, na qual a isquemia é realizada em diferentes lobos do fígado, como o lobo direito, o mediano, ou o esquerdo, na tentativa de evitar possíveis congestionamentos microvasculares do intestino, após isquemia e reperfusão hepática¹¹⁰. Com esta técnica, o tempo de isquemia pode ser ampliado em relação ao tempo de estudo do clampeamento total do pedículo hepático.

No entanto, a isquemia parcial vem demonstrando, em animais de pequeno porte, que a lesão pode culminar em apoptose, ou necrose, dependendo de outras variáveis, tais como as concentrações de ATP ou grau de hipóxia^{111,112}.

Esta técnica deve ser analisada com cuidado, pois os mecanismos inerentes de dano hepático, derivado da exclusão de massa hepática, devem ser considerados, já que o mesmo medicamento pode agir como um antagonista do receptor da

angiotensina II, e pode mostrar efeitos diferentes em lesão hepática, dependendo das condições cirúrgicas^{110,113,114}.

Um procedimento que vem sendo investigado é a aplicação de baixo consumo de energia de irradiação de laser, em que se avalia capacidade regenerativa de um pequeno fragmento do fígado, após hepatectomia de 70% em ratos, cuja regeneração pode ser de grande valia em situações clínicas críticas¹¹⁵.

Fatores que são de extrema importância para o sucesso de modelo experimental: o desenvolvimento, a gravidade e a extensão das alterações — tanto morfológicas, como funcionais — dependendo da espécie animal, do grau, da idade, do método, do local e da duração empregada^{109,113,114}.

Animais de pequeno e médio porte têm suas vantagens e desvantagens nos estudos, mas a escolha da espécie para o estudo depende do problema em questão e das diferenças nos modos de administração, dosagem, e uma degradação metabólica das drogas sob investigação¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Os animais de médio porte, como porcos, ovelhas e cães apresentam uma similaridade em sua anatomia e fisiologia, em comparação aos seres humanos; assim sendo, para um estudo clínico direto eles são os mais indicados¹¹⁹.

No entanto, seu uso é limitado por dificuldades logísticas, financeiras e, muitas vezes, por questões éticas. Além disso, o processamento de exames de sangue e tecidos é extremamente restrito por causa da disponibilidade limitada de ferramentas imunológicas para uso em grandes espécies animais¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Já os animais de pequeno porte, como camundongos e ratos, estes são extremamente úteis porque são bem mais simples de gerir, não apresentam tantos problemas de logísticas, financeiros ou éticos — como os de médio porte — e também podem fornecer o potencial de alterações genéticas (por exemplo, animais transgênicos e knockout).

Todavia, eles também apresentam desvantagens importantes, pois sua aplicabilidade para estudos clínicos tem que ser analisada com cuidado, no momento de comparar aos seres humanos, pois sua anatomia, fisiologia e metabolismo apresentam diferenças¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Ratos jovens apresentam diferenças significativas em relação à microcirculação de ratos idosos. Um rato maduro é o mais adequado, porque os ratos mais jovens podem apresentar problemas técnicos, enquanto que ratos mais velhos são mais propensos a infecções respiratórias e acúmulo de gordura¹²⁰.

A escolha sexual também afeta os resultados experimentais, como os níveis de hormônios presentes em animais fêmeas, o que certamente pode interferir na tolerância à isquemia do fígado. Estudo após isquemia hepática normotérmica mostrou que ratos machos foram menos sensíveis à lesão de reperfusão, em relação às fêmeas¹²⁰.

É necessária esta extrapolação entre estudos biomédicos com animais de experimentação e a sua correlação para os seres humanos, porém, com limitações, já que os obstáculos são grandes e devem ser levados em conta diferenças em:

hipotermia, tolerância à isquemia, anatomia das diversas espécies e subespécies, e as diferenças — entre e dentro — dos modelos experimentais utilizados.

Perante os dados apresentados, e as grandes controvérsias sobre os melhores métodos de clampeamento hepático, sentimos a necessidade de estudar as lesões de isquemia e reperfusão, buscando técnicas mais aprimoradas.

OBJETIVO

- Comparar as alterações mitocondriais hepáticas, após clampeamento total intermitente versus o clampeamento contínuo do pedículo hepático por período de 40 minutos em ratos Wistar.

CAPÍTULO

Submetido à revista Transplantation Proceedings e aceito para publicação conforme os anexos 2 e 3

THERE WAS NO PROTECTIVE FUNCTION IN WISTAR RATS SUBMITTED TO LONG ISCHEMIA TIME AND REPERFUSION AFTER INTERMITTENT CLAMPING OF THE TOTAL HEPATIC PEDICLE

Rodolfo dos Reis Tártaro¹, Gracinda de Lourdes Jorge², Marília Iracema Leonardi³, Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela⁴, Luiz Sérgio Leonardi⁵, Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin⁶.

1-Biologist, Masters student in Surgical Sciences Postgraduate Program – Faculty of Medical Science / State University of Campinas / SP / Brazil

2- Biomedical, Doctoral student in Surgical Sciences Postgraduate Program – Faculty of Medical Science / State University of Campinas / SP / Brazil

3- Doctor in Surgery - Department of Surgery, FCM / State University of Campinas / SP / Brazil

4- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Medical Science / State University of Campinas / SP / Brazil

5- Full Professor of Gastroenterological Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medical Science / State University of Campinas / SP / Brazil

6- Director of Unit of Liver Transplantation - Full Professor of Liver Hepatic Surgery at the Faculty of Medical Science / State University of Campinas / SP / Brazil

Corresponding author: Ilka FSF Boin – email: ilkaboin@yahoo.com, phone: +55 19 3521 8581 Rua Aldo Oliveira Barbosa 184 – Campinas/SP/Brazil – CEP 13086-030, fax: +55 19 32891577

Abstract

Although the intermittent Pringle maneuver is utilized for major transplant surgery, traumas and hepatic protection, long ischemia time and reperfusion may limit some protection in Wistar rats.

Aim: Evaluate the protection effects of intermittent clamping in the total hepatic pedicle after a long period of ischemia and reperfusion in Wistar rats.

Method: Forty-two male Wistar rats, weighing $\pm 327,7\text{g}$, anesthetized with sodium thiopental (iv) and subjected to a U-shaped incision in the abdomen. The total hepatic pedicle was isolated and subjected to a clamping with a microvascular clamp. Continuous Group (CG, n=14, 40 minutes of ischemia/40 minutes of reperfusion). Intermittent Group (IG, n=14, 4 cycles a 10 minute ischemia/reperfusion 10 minutes). Sham Group (SG, n=14, 80 minute observation time). Blood collection for transaminase dosage was carried out and as well as hepatic biopsies for mitochondrial respiration and histological evaluation.

Results: In groups CG and IG, AST and ALT enzymes were elevated in comparison to group SG ($p<0,008$); mitochondrias when stimulated by ADP or FCCP had a significant decrease in mitochondrial respiration ($p<0.05$), and the respiratory control ratio (RCR) in the ischemic groups was lower ($p<0.03$) when compared to the SG. In histology GC had 100%lesions: 33% focal hemorrhagic necrosis, 17% sinuzoidal congestion and/or vacuolization and 50% venous congestion; in GI had 100% lesions: 43% sinusoidal congestion and/or vacuolization and 57% venous congestion.

Conclusion: The intermittent total hepatic pedicle clamping for a long time in the Wistar rats had not efficacy to liver protection injury.

Keywords: ischemia, reperfusion injury, mitochondrial ADP, oxygen consumption

Introduction

The interruption of the afferent liver blood flow is necessary for the control of bleeding in liver transplants and traumas^{1, 2}.

In organisms submitted to hepatic ischemia followed by reperfusion can occurs ischemia-reperfusion injuries³⁻⁵. These injuries involve a complex cascade of events that includes the energy loss, the imbalance of ionic homeostasis the production of reactive oxygen species (ROS) and cellular death^{3,5}. In this context, the mitochondria plays a critical role once passes through major changes that may contribute to the injury of the organ during the phenomenon of ischemia-reperfusion⁶.

The intermittent clamping of the hepatic pedicle is one of the surgical options used in the routine of surgeons in interventions with long term⁴. It is important evaluate the hepatic rat tissue through intermittent long ischemia period such as hepatic protector. Some research has shown that severe liver injury are identified in postoperative period even in short-time of hepatic pedicle rats clamping⁷.

In the present study, we used the total hepatic ischemia in rats aiming at to compare the hepatic cell injury through two types of portal triad clamping.

Material and Methods

This research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA - 1646-1).

The surgeries were performed at the Laboratory of Unit of Liver Transplantation, the mitochondrial tests at the Laboratory of Bioenergetics, the histological analysis at the Laboratory of Pathology at the Experimental Medicine and Surgery (NMCE), and Pathology and Clinical Pathology Department – Unicamp.

In this study forty-two male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, rodent, *mammalia*) weighting $327.7 \pm 100.0\text{g}$ were included. The animals were provided by CEMIB (Surgery Vivarium-Unicamp).

The forty-two animals were randomly divided into three groups. After anesthetic procedure, trichotomy incision in a U shape⁷ were carried out. Isolation of the hepatic pedicle (hepatic artery, portal vein and bile duct) with flexible cotton buds was done and we began the intervention in each group.

In the sham group (SG) the animals were subjected to a total period of 80 minutes of observation, equivalent to the period of ischemia/reperfusion in the other groups. In the continuous group (CG) clamping was continuous for 40 minutes of ischemia followed 40 minutes of reperfusion. In the intermittent group (IG) clamping was carried out in four cycles of 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion.

After 40 minutes 1.0 ml of saline solution 0.9% in the peritoneum was applied. In the CG and IG the abdominal wall was maintained closed with three vascular clamps during ischemia period.

After the operative procedure, hepatic biopsies for mitochondrial respiration and histological evaluation were collected. Blood collection for aminotransferase serum levels was done. At the end of each experiment the animals were sacrificed by exsanguination under anesthesia.

The left lobe biopsy was put on 5,0 ml of preservation solution containing (2,77 mM CaK2EGTA, K2EGTA 7,23 mM, 6,65 mM MgCl₂.6H₂O, 15 mM creatineNa2Pospho, 20 mM imidazole, 0,5 mM of Dithiothreitol (DDT) and 50 mM MES) at 1,0 L with pH 7,1 in a beaker and kept in a cooler at 4 °C with crushed ice to mitochondrial analysis. A respirometry Oroborus (Innsbruck, Austria) and a magnetic stirrer with regular temperature at 37 °C were used to measure the oxygen consumption.

Two randomly samples were collected with an average weight of 4,0 and 6,0 mg and inserted into the apparatus tubs with 2,1 ml of MIRO5 reaction (0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂.6H₂O, 60 mM K-lactobionate, 20 mM Taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose and 1 g/L of BSA) with pH 7,2. Then mitochondrial respiratory activity was analyzed by sequential addition of 20 µL of pyruvate, 20 µL of malate, 20 µL of 42 mM ADP, 2 µL of a solution of 1 mg/ml of oligomycin, 0,8 µL of 1 mM solution of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). The data were determined using the specific software of the apparatus⁸⁻¹⁰.

Middle lobe liver biopsy were placed in a solution of 10% formalin for a maximum time of 24 hours. After this period it was placed in 70% ethanol, and dehydrated with alcohol and xylol battery and then embedded in paraffin and stained with hematoxylin x eosin (H&E) and Masson Trichrome¹¹.

Blood samples were collected (3,0 ml) by abdominal aorta catheterization for dosages of aspartate aminotransferase (AST; in IU/L), and alanine aminotransferase (ALT, in IU/L) which were performed by kinetic enzymatic method with automated equipment (MODULAR P800 EVO Hitachi high, Technologies Corporation, Tokyo, Japan)¹¹.

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA, Tukey test and t-Student test for comparison of means and descriptive frequency analysis for ordinal variables and the nonparametric Mann-Whitney test for continuous variables. The level of significance was 5%. SigmaStat program version 3,5 was used (Systat Software, Chicago, IL, EUA).

Results

All animals survived until the end of the experiment. In IG and CG mitochondrial respiration was inhibited in comparison to SG. There was a reduction in respiratory control ratio ADP/oligomycin and FCCP/oligomycin in ischemic groups when compared to the SG ($p<0.05$) (Figure 1).

In groups CG and IG, 100% of the animals showed histopathological disorders (Figure 2) as in GC: 33% focal hemorrhagic necrosis, 17% sinusoidal congestion and/or vacuolization and 50% of venous congestion branch; in IG: 43% sinusoidal congestion and/or vacuolization, 57% of venous congestion branch (Figure 2).

We observed a marked increase ($p < 0.008$) in transaminase in the ischemic groups (IG and CG) when compared to SG (Table 1).

Discussion

The role of ischemic preconditioning as liver protector in vascular occlusions has led to major debates about its effect on ischemia and reperfusion for long period¹²⁻¹⁵.

In the present study, we adopted two modalities of clamping of the hepatic pedicle in Wistar rats, aiming at to evaluate the protective factor in a long period of ischemia and reperfusion.

Many authors report that reperfusion injury is directly associated with mitochondrial dysfunction and increased ROS¹⁶⁻¹⁷, its exact mechanisms are not fully known.

We seeked to carry out evaluations of mitochondrial respiration directly in hepatic biopsies, thus avoiding possible damages to its structure as the irregular tubular network induced by mechanical homogenization; loss of soluble proteins and of other molecules from the mitochondrial matrix and degradation of mitochondrial matrix proteins by the insidious action of isolation present in the buffer in which can inhibit the activity of the vital functions⁸⁻¹⁰.

In our study mitochondrial respiration demonstrated a significant decrease in the ischemic animals, both in intermittent clamping and continuous clamping with inhibition of the respiratory state III (capacity of mitochondrial oxidative phosphorylation).

Regarding respiratory status IV, the groups of ischemic animals and control animals were similar as described in studies using isolated mitochondria⁸⁻¹¹.

Respiratory control was similar between ischemic animals and lower when compared to control animals. This reduction was 17% and 21%, respectively, in intermittent and continuous groups. Research using mitochondria isolated from rats also reported lower respiratory control¹⁸.

Some authors have demonstrated in models of ischemia and reperfusion performed in partial small pets that injury may culminate in apoptosis or necrosis, depending on other variables such as the concentrations of ATP or degree of hypoxia, emphasizing that the intermittent method, when compared to the continuous method, demonstrates a marked improvement¹¹⁻¹⁶.

In the GC, the lesions were more severe with the presence of venous congestion, sinusoidal congestion, vacuolization and focal hemorrhagic necrosis. However, in the IG the great injuries were intense venous and sinusoidal congestion and vacuolization. This occurred due to the long ischemia period in this study, although some authors had reported an improvement when the intermitent clamping was used in short-time¹⁸.

Aminotransferases (AST and ALT) are good markers of hepatic injury and ischemia widely used in clinical practice for patients accompaniments, pointing out changes in plasma membrane permeability, and their high levels depends the time of reperfusion^{11,15-18}.

Our results showed that the ischemic groups had a significant elevated levels of AST and ALT compared to control group after reperfusion. However when contrasted with ischemic groups this difference and protection has not corroborated.

Conclusion

We concluded that intermittent clamping of total hepatic pedicle in Wistar rats by long time had not efficacy in protecting liver injury in comparison to the continuous group.

References

1. Huguet C, Nordlinger B, Galopin JJ et al. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. Surg Gynecol Obst. 1978;147:689-93.
2. Giovanardi RO, Giovanardi HJ, Bozetti M, Garcia R, Lima LP. Intermittent total pedicular clamping in hepatic resections in non-cirrhotic patients. Hepatogastroenterology. 2002;49(45):764-9.

3. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*. 1991;13(1):83-95.
4. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menges MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol*. 2003;38(1):59-66.
5. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G15-26.
6. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest*. 1993;91(2):456-64.
7. Jorge GdL, Tártaro RdR, Facin ACC, Pereira RAT, Escanhoela CAF, Boin IFSF. Late Biliary Obstruction in Wistar Rats After Intermittent Hepatic Pedicle Clamping. *Transplant Proc*. 2014;46:1875-8.
8. Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, et al. Mitochondrial structure and are disrupted by standard isolation methods. *PloS One*. 2011;6(3):e18317.
9. Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttman E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem*. 2002;305(2):186-94.

- 10.** Morin D, Pires F, Plin C, Tillement JP. Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2004;15;68(10):2065-73.
- 11.** Castro e Silva Jr O, Centurion S, Pacheco EG, Brisott JL, Oliveira AF, Sasso KD. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras.* 2002;17:96-100.
- 12.** Elias D, Desruennes E, Lasser P. Prolonged intermittent clamping of the portal triad during hepatectomy. *Br J Surg.* 1991;78 (1):42-4.
- 13.** Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg.* 1999;229:369-75.
- 14.** Silva FN, Refinetti RA, Eulálio JMR. Biochemical assessment of ischemic preconditioning after hepatic ischemia and reperfusion in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2006;33(6):393-7.
- 15.** Gomes HMP, Serigiolle LC, Rodrigues DAB, Lopes CM, Studart SV, Leme PLS. Unfeasible experimental model of normothermic hepatic ischemia and reperfusion in rats using the Pringle maneuver. *ABCD, Arq Bras Cir Dig.* 2014;27(3):196-200.
- 16.** Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003;19;278(38):36027-31.

17. Radojkovic M, Stojanovic M, Stanojevic G, Bagur N, Jeremic L, Jovanovic M, et al. Intermittent or continuous occlusion of hepatic inflow. Bratisl Lek Listy. 2013;114(1):3-6.

18. Seyama Y, Imamura H, Inagaki Y, Matsuyama Y, Tang T, Makuuchi M, et al. Intermittent clamping is superior to ischemic preconditioning and its effect is more marked with shorter clamping cycles in the rat liver. J Gastroenterol. 2013;48:115-124.

Table 1: Tests of the liver profile and histological changes observed in the Sham group (SG) in the continuous group (CG) and the intermittent group (IG).

	SG	CG	IG	P
Laboratory tests				
AST (IU/L)	129,23 ± 38,82	2233,20 ± 216,24	1316,80 ± 1193,18	< .008
ALT (IU/L)	34,80 ± 15,58	1726,40 ± 617,25	1143,40 ± 617,25	< .008
Histologic aspects				
Congestion venous branch	Absent	50%	57%	< .05
Sinuzoidal congestion and/or vacuolization	Absent	17%	43%	< .05
Focal hemorrhagic necrosis	Absent	33%	Absent	< .05

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

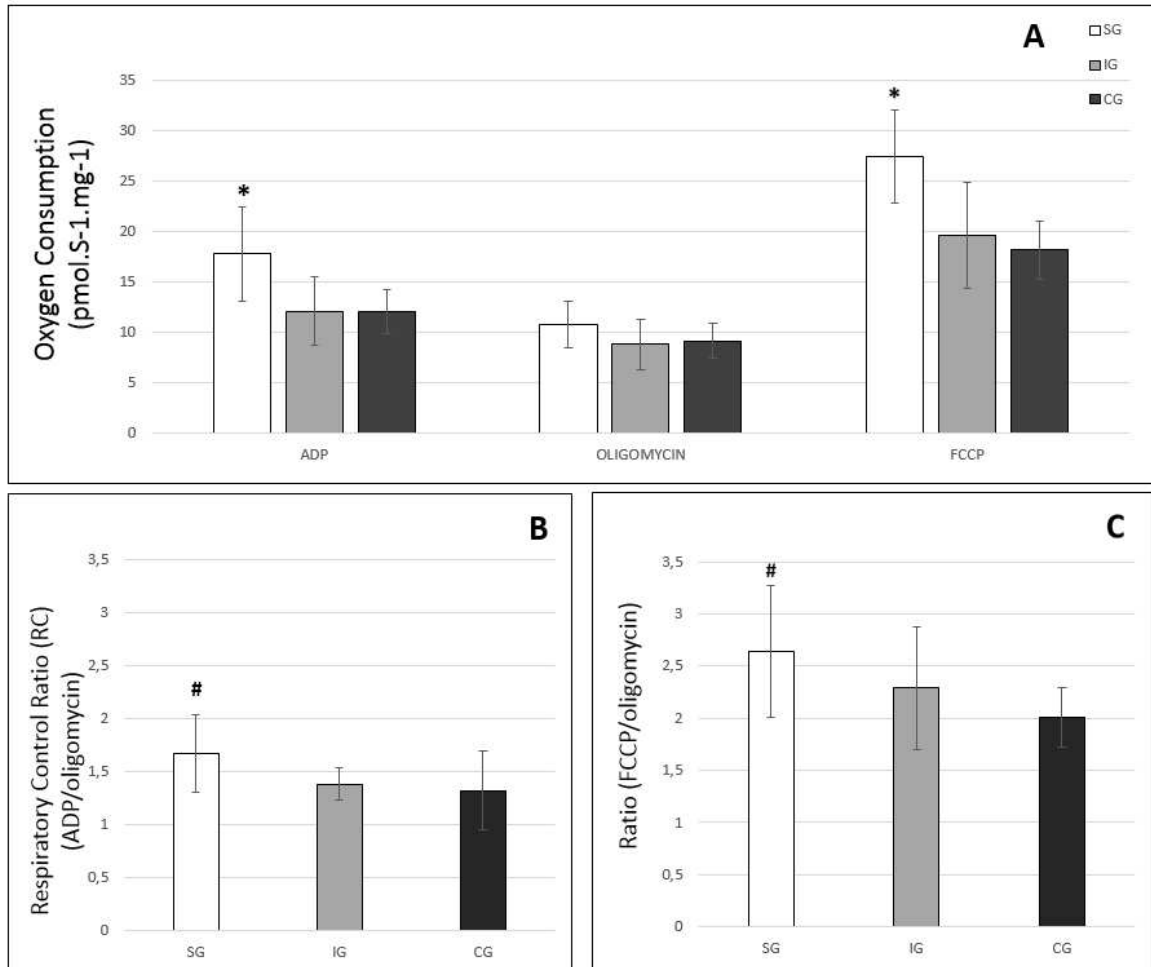


Figure 1: A - Ischemic groups both IG how much CG promoted inhibition of mitochondrial respiration in the biopsies stimulated by ADP or FCCP in relation to the SG, $p < 0.05$. Between IG and CG did not differ respiration. **B** - Respiratory control ratio (ADP/oligomycin) was reduced in the ischemic groups in relation to the SG, $p < 0.03$. **C** - The ratio (FCCP/oligomycin) was reduced in the ischemic groups compared to the SG, $p < 0.03$. When comparing between the IG and CG did not show differences. Statistical analysis: ANOVA Test ONE-WAY; (*) And (#) respectively $p < 0.05$ and $p < 0.03$; ADP = adenosine diphosphate; FCCP = carbonylcyanide ptrifluoromethoxyphenylhydrazine.

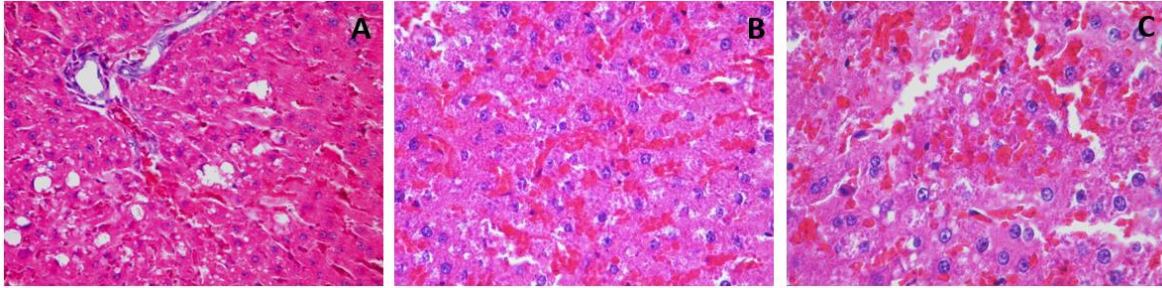


Figure 2. **A** - Liver parenchyma with preserved lobular structure. Note portal field with habitual aspect and hepatocytes vacuolation associated with intense sinusoidal congestion. (HE-400X), **B** - Severe sinusoidal congestion. (HE-500X) and **C** - Diffuse sinusoidal congestion with focal area of hemorrhagic necrosis (HE-640X).

CONCLUSÃO

As lesões hepáticas e as alterações da respiração mitocondrial, após longo tempo de isquemia e reperfusão, aconteceram independente do tipo de clampeamento utilizado, sendo que o grupo intermitente não se mostrou efetivo em evitar estas alterações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ryu CH, Lee SK. Biliary strictures after liver transplantation. Gut Liver. 2011;5(2):133-42.
2. Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, Haagsma EB. Biliary complications after liver transplantation: a review. Scand J Gastroenterol. 2006;(243):89-101.
3. Virani S, Michaelson JS, Hutter MM, Lancaster RT, Warshaw AL, Henderson WG, et al. Morbidity and mortality after liver resection: results of the patient safety in surgery study. J Am Coll Surg. 2007;204(6):1284-92.
4. Buell JF, Rosen S, Yoshida A, Labow D, Limsrichamrern S, Cronin DC, et al. Hepatic resection: effective treatment for primary and secondary tumours. Surgery. 2000;128(4):686-93.
5. Laurent C, Sa Cunha A, Couderc P, Rullier E, Saric J. Influence of postoperative morbidity on long-term survival following liver resection for colorectal metastases. Br J Surg. 2003;90(9):1131-6.
6. Lordan JT, Worthington TR, Quiney N, Fawcett WJ, Karanjia ND. Operative mortality, blood loss and the use of Pringle manoeuvres in 526 consecutive liver resections. Ann R Coll Surg Engl. 2009;91(7):578-82.
7. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. Ann Surg. 1908;48(4):541-9.

8. Huguet C, Nordlinger B, Galopin JJ, Bloch P, Gallot D. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. Surg Gynecol Obstet. 1978;147(5):689-93.
9. Cannon JA. Brief report. Transplant Bull. 1956;3:7.
10. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Hemotransplantation of the liver in humans. Surg Gynecol Obstet. 1963;117:659-76.
11. Gotoh M, Monden M, Sakon M, Kanai T, Umeshita K, Nagano H, et al. Hilar lobar vascular occlusion for hepatic resection. J Am Coll Surg. 1994;178(1):6-10.
12. Huguet C, Gavelli A, Bona S. Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. J Am Coll Surg. 1994;178(5):454-8.
13. Deschênes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. Transplantation. 1998;66(3):302-10.
14. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. Hepatology. 1991;13(1):83-95.

15. Aalto TK, Raivio KO. Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants and 3-aminobenzamide. *Pediatric Res.* 1993;34(5):572-6.
16. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science.* 1994;263(5147):687-9.
17. Szabó C, Zingarelli B, Salzman AL. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res.* 1996;78(6):1051-63.
18. Castro e Silva Jr O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras.* 2002;17(3):96-100.
19. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menges MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol.* 2003;38(1):59-66.
20. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1421-31.
21. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15(7):718-24.

22. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G15-26.
23. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol.* 1997;61(6):647-53.
24. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36027-31.
25. Kim YI, Ishii T, Aramaki M, Nakashima K, Yoshida T, Kobayashi M. The Pringle maneuver induces only partial ischemia of the liver. *Hepatogastroenterology.* 1995;42(2):169-71.
26. Quaresma AB, d'Campora AJ, Tramonte R, Farias DC, Joly FS. Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligation of right hepatic duct. *Acta Cir Bras.* 2007;22(1):68-78.
27. Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Évora PRB. The experimental basis of hepatic ischemia-reperfusion injury: review. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):3-12.
28. Elias D, Desruennes E, Lasser P. Prolonged intermittent clamping of the portal triad during hepatectomy. *Br J Surg.* 1991;78(1):42-4.
29. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg.* 1999;229(3):369-75.

30. Steenks M, Van Baal MC, Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Teo MH, et al. Intermittent ischaemia maintains function after ischaemia reperfusion in steatotic livers. *HPB (Oxford)*. 2010;12(4):250-61.
31. Jorge GL, Leonardi LS, Boin IFSF, Silva Jr OC, Escanhoela CAF. A new method for the experimental induction of secundar biliar cirrhosis in Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2001;16(2):75-81.
32. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand*. 1986;548:9-37.
33. Mitnacht SJr, Faber JL. Reversal of ischemia mitochondrial dysfunction. *J. Biol Chem*. 1981;256(7):3199-206.
34. Vercesi AE. The role of Ca^{2+} in the process of mithocondrial damage associated with oxidative stress. *Química Nova*. 1993;16:381-4.
35. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81(5):637-47.
36. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology*. 1995;108(1):252-75.
37. Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology*. 1990;11(4):690-8.

38. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*. 1992;15(3):507-14.
39. Woods HF, Krebs HA. Lactate production in the perfused rat liver. *Biochem J*. 1971;125(1):129-39.
40. Gorla N, Ferreyra EC, Villarruel MC, Fenos OM, Castro JA. Studies on the mechanisms of glutathione prevention of carbon tetrachloride-induced liver injury. *Br J Exp Pathol*. 1983;64(4):388-95.
41. Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 1):C315-22.
42. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, Ringe B, Lauchart W, Pichlmayr R. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation*. 1988;45(1):138-43.
43. Metzger J, Lauterburg BH. Postischemic ATP levels predict hepatic function 24 hours following ischemia in the rat. *Experientia*. 1988;44(5):455-7.
44. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(2):335-44.
45. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973;134(3):707-16.

46. Liu SS. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Biosci Rep.* 1997;17(3):259-72.
47. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(8):577-92.
48. Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Jimenez-Castro M, Peralta C. Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl.* 2011;17(9):993-1004.
49. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand.* 1980;492:153-68.
50. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981;81(1):22-9.
51. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47(5):412-26.
52. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery.* 1983;94(3):428-32.
53. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-63.
54. Kudo Y, Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y, Shimada T. Investigation of the renal injury caused by liver ischemia-reperfusion in rats. *Arch Toxicol.* 1993;67(7):502-9.

55. Pretto EA. Cardiac function after hepatic ischemia-anoxia and reperfusion injury: a new experimental model. *Crit Care Med.* 1991;19(9):1188-94.
56. De Tata V, Brizzi S, Saviozzi M, Lazzarotti A, Fierabracci V, Malvaldi G, et al. Protective role of dehydroascorbate in rat liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2005;123(2):215-21.
57. La Guardia PG, Alberici LC, Ravagnani FG, Catharino RR, Vercesi AE. Protection of rat skeletal muscle fibers by either L-carnitine or coenzyme Q10 against statins toxicity mediated by mitochondrial reactive oxygen generation. *Front Physiol.* 2013;4:103.
58. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 1992;307(1):108-12.
59. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):12-5.
60. Arduini A, Mezzetti A, Porreca E, Lapenna D, DeJulia J, Marzio L, et al. Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta.* 1988;970(2):113-21.
61. Jassem W, Ciarimboli C, Cerioni PN, Saba V, Norton SJ, Principato G. Glyoxalase II and glutathione levels in rat liver mitochondria during cold storage in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Transplantation.* 1996;61(9):1416-20.

62. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 2000;87(11):972-83.
63. Ku Y, Tominaga M, Fukumoto T, Nishida T, Maeda I, Kitagawa T, et al. Evaluation of role of leukocytes in hepatic reperfusion injury using a novel leukocyte removal system and nitro blue tetrazolium perfusion. *Transplant Proc.* 1995;27(1):718-20.
64. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991;78(6):651-5.
65. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):63-7.
66. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002;192(2):131-7.
67. Boin IFSF, Leonardi LS, Castro e Silva O Jr. Secondary alterations to ischemia/reperfusion injuries after partial hepatic ischemia in Wistar rats using WEB2086. In: Cavallari A, Mazziotti A, Principe A, editors. 2nd World Congress International Hepatopancreatobiliary Association. Bologna, Italy: Munduzzi;1996.pp.149-53.
68. Nieuwenhuijs VB, Bruijn MT, Schiesser M, Morphet A, Padbury RT, Barritt GJ. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2007;52(5):1159-67.

69. Schiesser M, Wittert A, Nieuwenhuijs VB, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Intermittent ischemia but not ischemic preconditioning is effective in restoring bile flow after ischemia reperfusion injury in the livers of aged rats. *J Surg Res.* 2009;152(1):61-8.
70. Pacheco EG, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Castro e Silva Jr O, Oliveira AF. Preconditioning with ischemic-reperfusion for protection from ischemic injury in rat liver cirrhosis preliminary result. *Acta Cir Bras.* 2001;16(1):41-3.
71. Teixeira AR, Molan NT, Kubrusly MS, Bellodi-Privato M, Coelho AM, Leite KR, et al. Postconditioning ameliorates lipid peroxidation in liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2009;24(1):52-6.
72. Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013;59(5):1094-106.
73. Canedo LF, Lima GV, Machado MC. Pulmonary effects after partial liver ischemia and reperfusion: experimental model. *Rev Col Bras Cir.* 2012;39(3):216-21.
74. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191:144-8.

75. Schneeberger S, Kuznetsov AV, Seiler R, Renz O, Meusburger H, Mark W, et al. Mitochondrial ischemia-reperfusion injury of the transplanted rat heart: improved protection by preservation versus cardioplegic solutions. *Shock*. 2008;30(4):365-71.
76. Milerova M, Charvatova Z, Skarka L, Ostadalova I, Drahota Z, Fialova M, et al. Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 2010;335(1-2):147-53.
77. Manintveld OC, Sluiter W, Dekkers DH, te Lintel Hekkert M, Lamers JM, Verdouw PD, et al. Involvement of reperfusion injury salvage kinases in preconditioning depends critically on the preconditioning stimulus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;236(7):874-82.
78. Varikmaa M, Guzun R, Grichine A, Gonzales-Granillo M, Usson Y, Boucher F, et al. Matters of the heart in bioenergetics: mitochondrial fusion into continuous reticulum is not needed for maximal respiratory activity. *J Bioenerg Biomembr*. 2013;45(4):319-31.
79. Lou PH, Lucchinetti E, Zhang L, Affolter A, Schaub MC, Gandhi M, et al. The mechanism of intralipid-mediated cardioprotection Complex IV inhibition by the active metabolite, palmitoylcarnitine, generates reactive oxygen species and activates reperfusion injury salvage kinases. *PLoS One*. 2014;9(1):e87205.

80. Scandroglio F, Tórtora V, Radi R, Castro L. Metabolic control analysis of mitochondrial aconitase: influence over respiration and mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Res.* 2014;48(6):684-93.
81. Kancirova I, Jasova M, Murarikova M, Carnicka S, Sumbalova Z, Ulicna O, et al. Adaptive changes of rat heart mitochondrial respiration: response of remote ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2014;103(1):S74-5.
82. Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, et al. Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PloS One.* 2011;6(3):e18317.
83. Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttman E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem.* 2002;305(2):186-94.
84. Morin D, Pires F, Plin C, Tillement JP. Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(10):2065-73.
85. Chu MJ, Hickey AJ, Jiang Y, Petzer A, Bartlett AS, Phillips AR. Mitochondrial dysfunction in steatotic rat livers occurs because a defect in Complex-I makes the liver susceptible to prolonged cold ischemia. *Liver Transpl.* 2015;21(3):396-407.

86. Velho JA, Okanobo H, Degaspero GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, et al. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology*. 2006;219(1-3):124-32.
87. Tavintharan S, Ong CN, Jeyaseelan K, Sivakumar M, Lim SC, Sum CF. Reduced mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with high-dose simvastatin: a possible role in statin-induced hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;223(2):173-9.
88. Sirvent P, Bordenave S, Vermaelen M, Roels B, Vassort G, Mercier J, et al. Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(3):1426-34.
89. Oliveira KA, Zecchin KG, Alberici LC, Castilho RF, Vercesi AE. Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(4):307-14.
90. Nadanaciva S, Bernal A, Aggeler R, Capaldi R, Will Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicol In Vitro*. 2007;21(5):902-11.
91. Kaufmann P, Torok M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krahenbuhl S. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(19-20):2415-25.

92. Centurion S, Brisotti JL, Oliveira GR, Tolentino E, Pacheco EG, Oliveira AF, Silva Jr OC. Evaluation of liver mitochondrial function submitted to partial ischemia following ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras*. 2001;16(1):61-2.
93. Gomes HM, Serigiolle LC, Rodrigues DA, Lopes CM, Studart SV, Leme PL. Unfeasible experimental model of normothermic hepatic ischemia and reperfusion in rats using the Pringle maneuver. *Arq Bras Cir Dig*. 2014;27(3):196-200.
94. Esteve JM, Mompo J, Garcia de la Asuncion J, Sastre J, Asensi M, Boix J, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J*. 1999;13(9):1055-64.
95. Kim YJ, Lee KT, Jo YC, Lee KH, Lee JK, Joh JW, et al. Hepatobiliary scintigraphy for detecting biliary strictures after living donor liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2011;17(21):2626-31.
96. Thethy S, Thomson BNj, Pleass H, Wigmore SJ, Madhavan K, Akyol M, et al. Management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *ClinTransplant*. 2004;18(6):647-53.
97. Sotiropoulos GC, Sgourakis G, Radtke A, Molmenti EP, Goumas K, Mylona S, et al. Orthotopic liver transplantation: T-tube or not T-tube? Systematic review and meta-analysis of results. *Transplantation*. 2009;87(11):1672-80.

98. Sharma S, Gurakar A, Jabbour N. Biliary strictures following liver transplantation: past, presente and preventive strategies. *Liver Transpl.* 2008;14(6):759-69.
99. Giovanardi RO, Giovanardi HJ, Bozetti M, Garcia R, Lima LP. Intermittent total pedicular clamping in hepatic resections in non-cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology.* 2002;49(45):764-9.
100. Radojkovic M, Stojanovic M, Stanojevic G, Bagur N, Jeremic L, Jovanovic M, et al. Intermittent or continuous occlusion of hepatic inflow. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(1):3-6.
101. Seyama Y, Imamura H, Inagaki Y, Matsuyama Y, Tang T, Makuuchi M, et al. Intermittent clamping is superior to ischemic preconditioning and its effect is more marked with shorter clamping cycles in the rat liver. *J Gastroenterol.* 2013;48(1):115-24.
102. Silva FN, Refinetti RA, Eulálio JMR. Biochemical assessment of ischemic preconditioning after hepatic ischemia and reperfusion in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2006;33(6):393-7.
103. Gurusamy KS, Sheth H, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;21(1):CD006409.

104. Rahbari NN, Kock M, Mehrabi A, Weidmann K, Motschall E, Kahlert C, et al. Portal triad clamping versus vascular exclusion for vascular control during hepatic resection: a systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Surg.* 2009;13(3):558-68.
105. Dixon E, Vollmer CM Jr, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg.* 2005;190(1):75-86.
106. Capussotti L, Nuzzo G, Polastri R, Giuliani F, Muratore A, Giovannini I. Continuous versus intermittent portal triad clamping during hepatectomy in cirrhosis. Results of a prospective, randomized clinical trial. *Hepatogastroenterology.* 2003;50(52):1073-7.
107. Richardson AJ, Laurence JM, Lam VW. Portal triad clamping versus other methods of vascular control in liver resection: a systematic review and meta-analysis. *HPB (Oxford).* 2012;14(6):355-64.
108. Jorge GdL, Tártaro RdR, Facin ACC, Pereira RAT, Escanhoela CAF, Boin AFSF. Late Biliary Obstruction in Wistar Rats After Intermittent Hepatic Pedicle Clamping. *Transplant Proc.* 2014;46(6):1875-8.
109. Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramírez A, Massip-Salcedo M, Serafín A, Rimola A, et al. Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and nonsteatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329(1):130-40.

110. Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padriisa-Altés S, Casillas-Ramires A, Rodés J, Roselló-Catafau J, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology*. 2008;47(2):461-72.
111. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:619-42.
112. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6(5):513-9.
113. Hayashi H, Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE. Hepatic ischemia model for determining the effects of ATP-MgCL₂ treatment. *J Surg Res*. 1986;40(2):167-75.
114. Chaudry IH, Clemens MG, Ohkawa M, Schleck S, Baue AE. Restoration of hepatocellular function and blood flow following hepatic ischemia with ATP-MgCL₂. *Adv in Shock Res*. 1982;8:177-86.
115. Araújo TG, de Oliveira AG, Tobar N, Saad MJ, Moreira LR, Reis ER, et al. Liver regeneration following partial hepatectomy is improved by enhancing the HGF/Met axis and Akt and Erk pathways after low-power laser irradiation in rats. *Lasers Med Sci*. 2013;28(6):1511-7.
116. Abdo EE, Cunha JE, Deluca P, Coelho AM, Bacchella T, Machado MC. Protective effect of N²-mercaptopropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process. *Arq Gastroenterol*. 2003;40(3):177-80.

117. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.* 2012;25(1):49-51.
118. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-30.
119. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):59-65.
120. Yahanda AM, Paidas CN, Clemens MG. Susceptibility of hepatic microcirculation to reperfusion injury: a comparison of adult and suckling rats. *J Pediatr Surg.* 1990;25(2):208-13.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

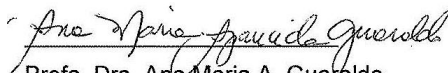
CERTIFICADO

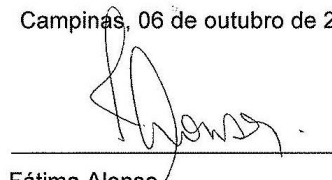
Certificamos que o Protocolo nº **1646-1**, sobre "Efeito do pré-condicionamento na isquemia/reperfusão hepática, analisando respiração mitocondrial no tecido de fígado de rato Wistar", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi / Gracinda de Lourdes Jorge**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de outubro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1646-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **October 6, 2008**.

Campinas, 06 de outubro de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 2 – Submissão do manuscrito a Transplantation Proceedings

TRANSPLANTATION PROCEEDINGS
BARRY D. KAHAN, PhD, MD, Editor-in-Chief

Editorial Office:

11707 Trudeau Drive

Houston, TX 77065

Telephone: 713-984-0533

Barry D. Kahan, PhD, MD - Editor-in-Chief
Johnson, Managing Editor

Bernadette

Email: bkahan@transplantation-proceedings.org
bjohnson@transplantation-proceedings.org

Email:

**THIS SIGNED FORM IS REQUIRED AND MUST BE ATTACHED WITH YOUR
MANUSCRIPT UPON SUBMISSION. WE WILL NOT PROCEED WITH YOUR
MANUSCRIPT REVIEW UNLESS THIS FORM IS ATTACHED.**

MANUSCRIPT RECEIPT - FINANCIAL AGREEMENT

Title Page With ALL Author Email Addresses: YES

Submitted Text Pages: 12

Submitted Tables: 1

Abstract Included YES

Submitted Figures: 2 (1 in color)

Total Pages Submitted (excluding Title Page and Abstract): 11

Manuscript Title: (PLEASE TYPE)

THERE WAS NO PROTECTIVE FUNCTION IN WISTAR RATS SUBMITTED TO
LONG ISCHEMIA TIME AND REPERFUSION AFTER INTERMITTENT CLAMPING
OF THE TOTAL HEPATIC PEDICLE

By submission of this manuscript to *Transplantation Proceedings*, I acknowledge I have read the Guidelines to Authors of Manuscripts Submitted in Conjunction with Meetings and agree with the contents, and that I have attached a completed and signed ACIS form on behalf of each author listed on this manuscript.

I also acknowledge that if accepted, I am responsible for all manuscript page charges, which will be billed to me by Elsevier, the publisher of *Transplantation Proceedings*, at the rate of US\$99.95 per submitted manuscript page, understanding that each Table and Figure will count as one manuscript page each along with the text. I understand that page charges are based on the typed, submitted page, not on the printed page, and no complimentary pages are automatically provided by *Transplantation Proceedings*. Authors will be contacted by the Editorial Office with a tracking number and will be informed of the final number of pages for which they are responsible. Further, I understand that use of color reproduction of graphics will result in an additional charge. The Abstract and Title page are complimentary by *Transplantation Proceedings*.

Additionally, I agree that this manuscript has not been submitted or published in any other journal, including *Transplantation Proceedings*, and no parts of the manuscript are duplicated. I understand that if the manuscript is accepted for publication, copyright of the manuscript is transferred to Elsevier.

Signature of Corresponding Author

Signature of Financially Responsible Party

ILKA FSF BOIN_____

Printed Name (family name in bold)

Printed Name (family name in bold)

Anexo 3 – Aceito para publicação em Transplantation Proceedings

De: "Barry D kahan MD, PhD" <bkahan@transplantation-proceedings.org>

Data: 11 de novembro de 2014 17:41:15 BRST

Para: <ilkaboin@yahoo.com>

Assunto: **LUSOBRAZIL14-15 Accepted for publication in Transplantation Proceedings**

Responder A: <bkahan@transplantation-proceedings.org>

LUSOBRAZIL14-15 Accepted for publication in Transplantation Proceedings

Dear DR. Boin

Thank you for submitting your manuscript *onsite* to Transplantation Proceedings in conjunction with the 12th Portuguese Transplantation Congress, 13th Luso-Brazilian Transplantation Congress and 1st Iberian Transplantation Congress 2014 meeting held in Lisbon. Manuscripts submitted onsite during the meeting had priority review, and you will be pleased to know that your manuscript **has been accepted** for publication for in a future 2015 issue of the journal. Your page proofs will be sent to you by Elsevier some time in 2015 once we complete all reviews, and once we determine the 2015 production schedule for issues to be published. You will receive no further communication from us.

Please remember that page charges are based on the typed, submitted page (not on the printed page) and are invoiced by our publisher, Elsevier, at US\$99.95 each. Each Table and Figure counts as one manuscript page each. There are no automatically assigned complimentary pages, therefore authors must assume financial responsibility for all manuscript pages.

Your manuscript contained 7 pages of text, 1 Tables and 2 Figure for a total of 10 pages received. You will be responsible for these pages at US\$99.95 each, payable upon invoice from Elsevier once they send the page proofs. No payment is due at this time.

As corresponding author on this paper, it is your responsibility to contact ALL authors listed to notify them of the manuscript tracking number and the outcome of this paper.

It is not necessary for you to respond to this email.

Your manuscript is: THERE WAS NO PROTECTIVE FUNCTION IN WISTAR RATS
SUBMITTED TO LONG ISCHEMIA TIME AND REPERFUSION AFTER
INTERMITTENT CLAMPING OF THE TOTAL HEPATIC PEDICLE

15 LUSOBRAZ14 Ilka FSF Boin ilkaboin@yahoo.com

With every good wish, I beg to remain,

Sincerely,

Barry D. Kahan, PhD, MD

Editor in Chief

Transplantation Proceedings

Anexo 4 – Direitos autorais

Dear Ilka,

Thank you for your e-mail. Please pass the below information onto your student.

Permission is covered by the rights you retain as an Elsevier journal author as outlined at <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-Responsibilities>, which include Inclusion in a thesis or dissertation, provided that proper acknowledgement is given to the original source of publication. Should you require any further clarification, please let me know.

Best of luck with your thesis.

Laura

Laura Stingelin

Permissions Helpdesk Associate

Elsevier

1600 John F. Kennedy Boulevard

Suite 1800

Philadelphia, PA 19103-2899

T: (215) 239-3867

F: (215) 239-3805

E: l.stingelin@elsevier.com

Questions about obtaining permission: whom to contact? What rights to request?

When is permission required? Contact the Permissions Helpdesk at:

+1-800-523-4069 x 3808 permissionshelpdesk@elsevier.com

Anexo 5 – Certificados de Apresentação em Congressos Internacionais

131



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação

**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO PAULO**



Certificado

Conferido a **Rodolfo dos Reis Tártaro, Gracinda de Lourdes Jorge, Marília Iracema Leonardi, Cecília Amelia Fazzio Escanhoela, Aníbal Eugênio Vercesi, Luiz Sérgio Leonardi, Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin.** pela apresentação de Trabalho pôster no evento: **XIV CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIRURGIA EXPERIMENTAL – SOBRADPEC e I FÓRUM PESQUISA CIRURGIA TRANSLACIONAL UNIFESP / EPM**, realizado no Pestana São Paulo Hotel & Conference Center em São Paulo, realizado no período de 18 de setembro a 20 de setembro de 2014.

TEMA: O clampeamento intermitente do pedículo hepático total, num tempo longo de isquemia e reperfusão no rato wistar, não exerce função protetora.

São Paulo, 20 de setembro de 2014.



Prof. Dra. Florianita Coelho Braga Campos
Pró Reitora de Extensão



Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira
Presidente do Congresso



Prof. Dr. Saul Goldenberg
Presidente Fundador da SOBRADPEC



Rudiney M. Trindade
Pró-Reitoria de Extensão

Curso de Extensão
Certificado registrado sob o N.1461
Livro 01/2014 Página: 47
SP 20/09/2014



XII CONGRESSO
PORTUGUÊS DE
TRANSPLANTAÇÃO
XIII CONGRESSO
LUSO BRASILEIRO
DE TRANSPLANTAÇÃO
I ENCONTRO IBÉRICO
DE TRANSPLANTAÇÃO
9-11 OUTUBRO 2014
SANA LISBOA HOTEL - LISBOA - PORTUGAL

CERTIFICADO

Certifica-se que o trabalho

O CLAMPEAMENTO INTERMITENTE DO PEDÍCULO HEPÁTICO TOTAL, NUM TEMPO LONGO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO NO RATO WISTAR, NÃO EXERCE FUNÇÃO PROTETORA

Rodolfo dos Reis Tártaro, Gracinda de Lourdes Jorge, Marília Iracema Leonardi, Cecília Amelia Fazzio Escanhoela, Aníbal Eugénio Vercesi, Luiz Sérgio Leonardi, Ilka de Fátima Santana Ferreira

Foi apresentado sob a forma de Poster no decorrer do XII Congresso Português de Transplantação | XIII Congresso Luso Brasileiro de Transplantação | I Encontro Ibérico de Transplantação, realizado de 09 a 11 de Outubro de 2014, no Sana Lisboa Hotel, Lisboa, Portugal

Domingos Machado

Domingos Machado
Presidente do Congresso

Fernando Macário

Fernando Macário
Presidente da SPT

Anexo 6 – Normas da redação da Dissertação

Esta Dissertação de Mestrado “O CLAMPEAMENTO TOTAL INTERMITENTE DO PEDÍCULO HEPÁTICO POR LONGO TEMPO, EM RATO WISTAR, NÃO EXERCE FUNÇÃO PROTETORA“, seguiu as normas da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), do programa Ciências da Cirurgia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), conforme as normas de Vancouver, <http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pos-graduacao-em-ciencias-da-cirurgia>.

Anexo 7 – Gráficos de respiração mitocondrial em biopsia hepática dos grupos GCL, GI e GC representado respectivamente A, B e C.

