



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

RODOLFO DOS REIS TARTARO

Avaliação da recuperação das lesões hepáticas, através da histologia, bioquímica e da respiração mitocondrial, após manobra de Pringle em diferentes períodos de isquemia e reperfusão, em ratos Wistar

Evaluation of the liver injury recovery through histology, biochemistry and mitochondrial respiration after Pringle Maneuver in different periods of ischemia and reperfusion in Wistar rats

CAMPINAS

2020

RODOLFO DOS REIS TARTARO

Avaliação da recuperação das lesões hepáticas, através da histologia, bioquímica e da respiração mitocondrial, após manobra de Pringle em diferentes períodos de isquemia e reperfusão, em ratos Wistar

Evaluation of the liver injury recovery through histology, biochemistry and mitochondrial respiration after Pringle Maneuver in different periods of ischemia and reperfusion in Wistar rats

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de **Doutor** em Ciências, área de concentração Fisiopatologia Cirúrgica.

Doctoral Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas – UNICAMP as part of the for obtaining the title of **Doctor** of Science, area of concentration in Physiopathology, Surgical.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
RODOLFO DOS REIS TARTARO, E ORIENTADA PELO
PROF^a. DR^a. ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN.

CAMPINAS

2020

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

T178a Tártaro, Rodolfo dos Reis, 1984-
Avaliação da recuperação das lesões hepáticas, através da histologia, bioquímica e da respiração mitocondrial, após manobra de Pringle em diferentes períodos de isquemia e reperfusão, em ratos Wistar / Rodolfo dos Reis Tártaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Isquemia. 2. Reperfusão. 3. Constrição. 4. Mitocôndria. 5. Ratos Wistar. 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: Evaluation of the liver injury recovery through histology, biochemistry and mitochondrial respiration after Pringle maneuver in different periods of ischemia and reperfusion in Wistar rats

Palavras-chave em inglês:

Ischemia
Reperfusion
Constriction
Mitochondria
Wistar rat

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin [Orientador]
Elaine Cristina de Ataíde
Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono
Renato Ferreira da Silva
Wellington Andraus

Data de defesa: 20-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4350-1150>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6089518232061397>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RODOLFO DOS REIS TARTARO

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

MEMBROS:

- 1. PROF^a. DR^a. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin**
- 2. PROF^o. Dr. Wellington Andraus**
- 3. PROF^o. Dr. Renato Ferreira da Silva**
- 4. PROF^a. Dr^a. Elaine Cristina de Ataíde**
- 5. PROF^a. Dr^a. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data: 20/02/2020

DEDICATÓRIA

À todos os meus familiares, por me encorajar e apoiar incansavelmente,
tornando assim, com que eu acreditasse neste sonho plausível:

Paulo Tártaro,

Zenaide dos Reis Tártaro,

Camila dos Reis Tártaro Ishibashi,

Márcio Yoshio Ishibashi,

Eleonora Tártaro Ishibashi

e ao João Paulo Tártaro Ishibashi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, ao Mestre Jesus, aos bons espíritos e ao meu anjo guardião que me iluminaram, encaminharam, fornecendo o equilíbrio, a força e a coragem necessária durante toda esta minha jornada.

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

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

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

À Doutora Gracinda de Lourdes Jorge, pelos 14 anos de dedicação em me conduzir ao fascinante universo da pesquisa científica, pela sua preciosa amizade conquistada durante todos estes anos de muito aprendizado, incentivo, carinho, paciência, companheirismo, me mostrando o caminho correto e ético, me tornando assim, um profissional e uma pessoa melhor.

À Professora Doutora Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, pela grande assessoria durante as avaliações histológicas.

Ao Professor Doutor Luiz Sérgio Leonardi, por abrir as portas do Laboratório de Transplante Hepático Experimental do NMCE durante minha graduação.

Ao Professor Doutor Aníbal Eugenio Vercesi, que abriu as portas do Laboratório de Bioenergética do NMCE e confiou em nosso potencial e em nosso trabalho.

Ao Professor Doutor Roger Frigério Castilho, que possibilitou o meu aprimoramento e crescimento durante meus estudos.

À farmacêutica bioquímica, Ana Cândida Coutinho Facin, pela colaboração nas avaliações bioquímicas.

Ao Professor Mestre Antônio Henrique Dianin, pela amizade e a oportunidade de trabalharmos juntos, abrindo assim, novos horizontes e possibilidades de estudos.

Ao Professor Doutor Konradin Metze e a 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, amizade, respeito, ensinamentos e muito amor durante esta minha jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação durante os meus estudos, com código de financiamento 001.

Aos meus 50 irmãos de república, que me apoiaram sempre com suas brincadeiras, atitudes, ensinamentos e alegrias durante os bons e não tão bons momentos.

Ao meu irmão, Leopoldo dos Reis Tártaro, (in memoriam) por me dar bons exemplos, sempre me aconselhando, me mostrando que devemos batalhar por aquilo que acreditamos e sempre demonstrando seu grande amor e carinho com todos ao seu redor.

EPÍGRAFE

“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita, torna-se realidade.”

Buda

RESUMO

Introdução: pesquisas relacionadas à isquemia e reperfusão (I/R) hepáticas por interrupção rápida ou período maior da tríade portal em ratos Wistar, têm demonstrado sérias complicações¹⁻⁴. **Objetivo:** avaliar o efeito protetor do pré-condicionamento e recuperação de lesões hepáticas tardiamente, após I/R em ratos Wistar, através da respiração mitocondrial, bioquímica e histologia do fígado. **Método:** utilizados 48 ratos Wistar machos, peso médio 307 ± 44 g, oito semanas, divididos em dois estudos. Para variáveis ordinais foi realizada análise descritiva, o teste não paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis contínuas e o teste de Kruskal-Wallis para comparar duas ou mais amostras, com significância de $p < 5\%$. No primeiro estudo foram divididos em dois grupos: Pré-Condicionamento (GPC $n=10$), o pedículo hepático foi isolado e submetido ao clampeamento por (10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão, seguidos por 30 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão), após este tempo coleta de exames e biópsias. No Grupo Operação Simulada (GOS $n=10$), submetidos à manipulação do pedículo hepático em tempos equivalentes ao período de I/R do grupo isquêmico, com exceção do clampeamento. No segundo estudo foram divididos em quatro grupos: grupo imediato (GI), grupo operação simulada imediato (GOSI), grupo tardio (GT) e grupo operação simulada tardio (GOST). Nos grupos isquêmicos (GI e GT) com nove animais em cada grupo, o pedículo hepático foi isolado e submetido ao clampeamento por 20 minutos, seguido de 20 minutos de reperfusão. Nos grupos controles (GOSI e GOST) cinco animais em cada grupo, submetidos à manipulação do pedículo hepático equivalente ao período de I/R nos demais grupos, com exceção do clampeamento. Nos grupos imediatos (GI GOSI), após o procedimento cirúrgico foi realizada a coleta de exames e biópsias. Os animais dos grupos tardios (GT e GOST), após estes tempos de I/R, foi realizado o fechamento da

parede abdominal em plano único, contínuo, com fio de algodão 3-0. No 28º dia de pós-operatório, os animais foram anestesiados e reabertos para coleta de exames e biópsias. **Resultados:** no primeiro estudo as mitocôndrias do GPC apresentaram semelhanças ao GOS, quando estimulada com adição da adenosina difosfato (ADP) e carbonylcyanide p-trifluormetoxifenilidrazona (FCCP). Na razão do controle respiratório (RCR) e o estado de repouso os grupos GPC e GOS foram semelhantes. O GPC apresentou AST/ALT elevadas ($p<0.03$), 60% de congestão sinusoidal e congestão venosa na análise histológica quando comparada ao GOS. No segundo estudo as mitocôndrias dos grupos isquêmicos quando estimulada por ADP ou FCCP, tiveram diminuição significativa da respiração ($p<0.001$), a RCR no grupo GI ($p<0.02$) quando comparado ao GOSI, a RCR do GT quando comparado ao GOST não houve diferença significativa. Na histologia apresentaram: dilatação sinusoidal de 55,55% no GI e 66,66% no GT, balonização 77,77% no GI e 55,55% no GT, necrose focal 11,11% nos grupos GI e GT. **Conclusão:** concluímos que o pré-condicionamento apresentou efeito protetor da respiração mitocondrial com leve distúrbio bioquímico e histológico de imediato e que há viabilidade de recuperações de lesões hepáticas por I/R em ratos Wistar tardiamente.

Palavra chave: isquemia, reperfusão, constrição, mitocôndria, rato Wistar.

ABSTRACT

Introduction: Research related to hepatic ischemia and reperfusion (I/R) due to rapid interruption or longer period of portal triad in Wistar rats has shown serious complications¹⁻⁴. **Objective:** To evaluate the protective effect of preconditioning and late liver injury recovery after I/R in Wistar rats through mitochondrial respiration, biochemistry and liver histology. **Method:** 48 male Wistar rats, mean weight 307 ± 44 g, eight weeks old, were divided in two studies. Descriptive analysis was carried out for ordinal variables, Mann-Whitney nonparametric test for continuous variables and Kruskal-Wallis test to compare two or more samples, with significance of $p < 5\%$. In the first study, the subjects were divided in two groups: Preconditioning (PCG n=10) and In the Simulated Operation Group (SOG n=10). In the PCG, the hepatic pedicle was isolated and clamped for (10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion, followed by 30 minutes of ischemia and 30 minutes of reperfusion). Later, samples were collection of exams and biopsies. In the SOG, subjects were submitted to manipulation of the hepatic pedicle at times equivalent to the I/R period of the ischemic group, except for clamping. In the second study, the subjects were separated in four groups: immediate group (IIG), immediate simulated operation group (ISG), late group (LIG) and late simulated operation group (LSG). The ischemic groups (IIG and LIG) possessed nine animals in each group. The hepatic pedicle was isolated and clamped for 20 minutes, followed by 20 minutes of reperfusion. In the control groups (ISG and LSG) five animals in each group, submitted to manipulation of the hepatic pedicle equivalent to the I/R period in the other groups, except for clamping. In the immediate groups (IIG, ISG), after the surgical procedure, exams and biopsies were collected. The animals of the late groups (LIG, LSG), after these I/R times, the abdominal wall was closed in a single plane, continuous, with 3-0 cotton thread. On the 28th

postoperative day, the animals were anesthetized and reopened for exams and biopsy collection. **Results:** In the first study, PCG mitochondria showed similarities to SOG when stimulated with the addition of adenosine diphosphate (ADP) and carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylidrazon (FCCP). Respiratory control (RCR) and resting state in the PCG and SOG groups were similar. The PCG presented high AST/ALT ($p<0.03$), 60% sinusoidal congestion and venous congestion on histological analysis when compared to SOG. In the second study, mitochondria of the ischemic groups when stimulated by ADP or FCCP had significant decrease in respiration ($p<0.001$), RCR in IIG group ($p<0.02$) when compared to ISG, the RCR of LIG when compared to LSG there was no significant difference. In the histology presented sinusoidal dilation was 55.55% in IIG and 66.66% in LIG, ballooning 77.77% in IIG and 55.55% in LIG, focal necrosis 11.11% in IIG and LIG groups. **Conclusion:** We concluded that preconditioning had a mitochondrial respiration protective effect with mild biochemical and histological disturbance immediately and that there is viability of liver injury recovery by I/R in belatedly Wistar rats.

Keywords: ischemia, reperfusion, constriction, mitochondria, Wistar rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

Figura 1: Fluxograma do primeiro estudo32

Figura 2: Fluxograma do segundo estudo34

Figura 3: Gráfico utilizando o softwer específico do aparelho OROBOROS36

Primeiro Artigo

Figura 140

A - Velocidade de respiração mitocondrial em biópsia de fígado.

B - Razão do controle respiratório (ADP/oligomicina).

C - Razão do controle respiratório (FCCP/oligomicina).

Figura 241

A - GOS, espaço porta e veia centro (HE - 200x).

B - GPC, congestão sinusoidal e congestão venosa (HE - 200x).

C - GPC, congestão venosa e veia centro lobular (HE - 100x).

Segundo Artigo

Figura 144

A - GOSI, (HE - 320x).

B - GI, balonização, (HE - 160x).

C - GI, dilatação sinusoidal, (HE - 160x).

D - GI, foco de necrose, (HE - 220x).

E - GOST, (HE - 320x).

F - GT, balonização, (HE - 160x).

G - GT, dilatação sinusoidal, (HE - 320x).

H - GT, foco de necrose, (HE - 400x).

Figura 245

A - Velocidade de respiração mitocondrial em biópsia de fígado.

B - Razão do controle respiratório (ADP/oligomicina).

C - Razão do controle respiratório (FCCP/oligomicina).

LISTA DE TABELAS

Primeiro Artigo

Página

Tabela 1: Perfil hepático e alterações histológicas observadas entre o Grupo Operação Simulada – GOS e o Grupo Pré-Condicionamento – GPC	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

I/R – Isquemia e Reperusão

ERO – Espécie reativa de oxigênio

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

Na⁺ – Sódio

K⁺ – Potássio

Ca²⁺ – Cálcio

O₂ – Oxigênio

H₂O – Água

O₂ •- – Radical superóxido

TPMM – Transição da permeabilidade da membrana mitocondrial

CTE – Cadeia transportadora de elétrons

Complexo I – Complexo um da cadeia transportadora de elétrons

Complexo II – Complexo dois da cadeia transportadora de elétrons

Complexo III – Complexo três da cadeia transportadora de elétrons

Complexo IV – Complexo quatro da cadeia transportadora de elétrons

ADP – Adenosina difosfato

RCR – Razão do controle respiratório

FCCP – carbonylcyanide p-trifluormetoxifenilidrazona

NMCE – Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

LAP – Laboratório de Anatomia Patológica

HC – Hospital de Clínicas

LPC – Laboratório de Patologia Clínica

CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas

GPC – Grupo pré-condicionamento
GOS – Grupo operação simulada
GI – Grupo imediato
GOSI – Grupo operação simulada imediato
GT – Grupo tardio
GOST – Grupo operação simulada tardio
EGTA – Ácido egtázico
DDT – Dithiothreitol
UI/L – Unidades internacional por litro
HE – Hematoxilina-Eosina
L – litro
min – minuto
g – grama
mg – miligrama
Kg – kilograma
cm – centímetro
mL – mililitro
dL – decilitro
mm – milímetro
RJ – Rio de Janeiro
SP – São Paulo
rpm – Rotação por minuto
°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

Página

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	29
MÉTODO	30
RESULTADOS	38
(Artigo 1)	38
(Artigo 2)	43
DISCUSSÃO GERAL	47
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	72
ANEXO I (Comitê ética primeiro artigo)	72
ANEXO II (Comitê ética segundo artigo)	73
ANEXO III (Direitos autorais)	74
ANEXO IV (Certificados em congressos Nacionais e Internacionais)	76

INTRODUÇÃO

Um dos tratamentos mais indicados para doentes com insuficiência hepática terminal e hepatite aguda grave é o transplante hepático, sendo que a sobrevida destes doentes vem aumentando eficientemente nos últimos anos devido aos avanços nas técnicas cirúrgicas cada vez mais aprimoradas, a utilização de equipamentos cada vez mais sofisticados e a utilização de drogas protetoras¹⁻⁷.

A isquemia e reperfusão (I/R) são procedimentos muitas vezes necessários para o controle de hemorragias durante ressecções, traumas e transplantes hepáticos⁵⁻¹⁷. A isquemia é a diminuição ou suspensão do fluxo sanguíneo para alguma área do organismo, podendo ser ocasionada por obstrução arterial ou por vasoconstrição⁵⁻¹⁷. A reperfusão é o retorno deste fluxo sanguíneo para o local no qual ocorreu a isquemia⁵⁻¹⁷.

O procedimento cirúrgico utilizado para a obtenção de exclusão do fluxo sanguíneo ao fígado, como forma de prevenção e tratamento para a contenção de hemorragias hepáticas, nas ressecções hepáticas e nos transplantes de fígados é a manobra de Pringle, na qual é realizada a oclusão contínua e concomitantemente da artéria hepática, da veia porta e das vias biliares^{1-4,6,17-21}.

Esta interrupção da irrigação sanguínea ao fígado, durante procedimentos cirúrgicos com a finalidade de evitar sangramentos, demonstram diversos danos ao órgão; perante isso foram desenvolvidas outras técnicas cirúrgicas afim de se minimizar os danos e suas consequências a curto e longo prazo, como o clampeamento intermitente e o pré-condicionamento¹⁻⁴.

Nas intervenções de longa duração, o clampeamento intermitente do pedículo hepático é uma das opções cirúrgicas utilizadas, em que se intercalam períodos de isquemia seguido de reperfusão repetidas vezes, evitando-se um período longo de hipóxia ao órgão²²⁻²⁸.

O pré-condicionamento isquêmico, tem levado a grandes discussões sobre o seu efeito protetor, onde se inicia a oclusão da tríade portal com curtos períodos de I/R, seguido por um tempo prolongado de I/R^{14,29-36}.

Existem duas técnicas cirúrgicas de I/R do pedículo hepático, tanto a intermitente quanto a de pré-condicionamento que foram desenvolvidas com a finalidade de reduzirem o grau de lesões hepáticas em períodos comparáveis à técnica de clampeamento contínuo^{1-4,22-36}.

As lesões de I/R hepáticas são demonstradas através de estudos após a oclusão seguida de revascularização hepática; esta interrupção rápida ou por período prolongado do pedículo hepático, tem demonstrado várias complicações, prejudicando a regeneração hepatocelular, sendo ainda um dos principais obstáculos, ocasionando disfunção hepática, morbidade e mortalidade operatórias durante ressecções hepáticas, assim como no transplante de fígado^{1-5,8,18-21,27,28,32-45}.

Entretanto a lesão de I/R é um fenômeno complexo e não está totalmente explicado, envolvendo uma complexa cascata de eventos em que se englobam: as alterações enzimáticas, a perda de energia, o desequilíbrio da homeostasia iônica, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o comprometimento da função mitocondrial, a oclusão de microvasos e a morte celular^{1-5,8,39-56}.

A lesão de I/R pode ser secundárias a: isquemia fria (hipotérmica) e isquemia quente (normotérmica). A primeira ocorre durante o armazenamento e preservação do órgão para transplantes, já a segunda tem grande relevância para cirurgias hepáticas^{1-3,5,8,11}. Em ambos os processos são produzidos ERO, sendo que na isquemia normotérmica essa lesão de I/R é considerada mais prejudicial ao metabolismo e às vias moleculares, pois na isquemia hipotérmica o metabolismo e o consumo de adenosina trifosfato (ATP) são significativamente menores^{1-3,5,8,11}.

As lesões de I/R também podem ser analisadas de duas formas distintas: a fase inicial e a fase tardia^{1,11,13}. Na fase inicial em que ocorre até duas horas após a reperfusão, corresponde a resposta das células de Küpffer, pelo estresse oxidativo liberado por citocinas pró-inflamatórias, mediante a privação de nutrientes e de oxigênio ao órgão^{1,11,13}. Na fase tardia, em que ocorre lesões causadas entre 6 a 48 horas após a reperfusão do órgão, ocorre uma resposta inflamatória mediada pelo recrutamento de neutrófilo associado ao dano durante a liberação da ERO^{1,11,13}.

Atualmente se conhece os efeitos causados durante a I/R do fígado nestas duas fases; inicial e tardia, mas pouco se conhece sobre os seus efeitos após um pós-operatório prolongado, visando as possíveis recuperações celulares e a permanência destes danos, sendo importante para qualidade de vida dos doentes.

Estas lesões podem ser detectadas através das dosagens das enzimas séricas, da respiração mitocondrial e da histologia do fígado^{27,28,33,34,51,57-61}.

A análise das lesões de I/R são detectadas através das enzimas séricas liberadas após o rompimento celular hepático, passando para o sistema circulatório, fornecendo informações clínicas da extensão, magnitude e curso (aguda ou crônica)

da lesão; são consideradas marcadores sensíveis de dano hepatocelular e observadas antes ou logo após o procedimento cirúrgico, estando diretamente correlacionada com o tempo de hipóxia sofrida pelo órgão e da reperfusão do parênquima remanescente^{57-59,62-66}.

As transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em elevadas concentrações, são marcadores de lesões do fígado e frequentemente utilizadas na prática clínica para as avaliações dos doentes e nas alterações da permeabilidade da membrana plasmática^{34,57-59}.

A AST é uma enzima que pode ser encontrada tanto no fígado, como no pâncreas, nos rins, nos músculos esqueléticos e no miocárdio, sendo que qualquer dano celular nestes tecidos pode resultar na elevação de seus níveis séricos⁵⁷⁻⁵⁹.

A ALT é mais utilizada para a avaliação do fígado, pois a elevação dos níveis séricos quando ocorrem danos hepáticos excedem a concentração do miocárdio e de outros órgãos; sua elevação está relacionada ao dano hepatocelular agudo⁵⁷⁻⁵⁹.

Tanto o método de oclusão vascular contínuo, quanto intermitente acabam elevando de forma intensa as concentrações destas enzimas AST e ALT em estudos experimentais, induzido por um efeito deletério mais acentuado^{27,28,32,33,49}, entretanto estudos demonstram que o pré-condicionamento isquêmico levam a um aumento de forma mais moderada, minimizando os danos sofridos após I/R do órgão^{34-36,46,47,58}.

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção da maior parte da energia celular, através do processo chamado de respiração celular, que utiliza a cadeia transportadora de elétrons (CTE), presente na membrana mitocondrial

interna^{1,32,39,40,42,67-69}. Dependendo do tipo de célula, há variação do tamanho, da forma, da quantidade e da distribuição das mitocôndrias^{1,32,39,40,42,67-69}.

Sendo assim, a atividade respiratória mitocondrial e a geração de radicais livres, são consideradas bons parâmetros para se avaliar a lesão de I/R do fígado; a mitocôndria tem incumbência essencial, uma vez que passa por diversas modificações e podem contribuir para o dano do órgão durante o fenômeno de I/R^{1,27,30,32,39,40-46,51,53,56,68}.

O período de anóxia está relacionado com a falta de energia ao órgão, levando a um metabolismo anaeróbico ocasionando a redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) pela CTE, levando ao aumento da produção de hipoxantina, aumentando o influxo de cálcio (Ca^{2+}), lise das proteínas estruturais e das membranas, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial acarretando uma alteração no sistema de fosforilação oxidativa^{1,67-69}.

A depleção de ATP por hipóxia e há escassez de energia, ocorre falhas na bomba de sódio (Na^+) e potássio (K^+), que está localizada na membrana celular, iniciando assim a entrada de sódio e água, para o meio intracelular e a saída do potássio, para o meio extracelular, deixando a célula mais túrgida, podendo levar ao edema intracelular, dependendo do tempo de hipóxia^{1,11-13,32,70-73}.

Neste contexto inicia-se a acidose intracelular em decorrência da redução de ATP que é provocada pela glicólise anaeróbica e consequente acúmulo do ácido láctico; essa redução do pH intracelular inicial, em níveis moderados, atua como um citoprotetor por inibir a ação das hidrolases^{1,74-76}.

Com a intensificação do meio ácido intracelular, esta função de citoproteção deixa de ser vantajosa e começa a atuar de forma antagônica, desfavorecendo a cinética normal das enzimas, privando a célula dos seus mecanismos normais para manutenção da homeostasia celular^{1,32,39-42}.

A redução da ATP está diretamente relacionada com o período da isquemia, mas um dos fatores essenciais da viabilidade da função do fígado é a velocidade com que a reoxigenação é restaurada durante a reperfusão^{1,32,77,78}.

Com a restituição da reperfusão ocorre consequências positivas ao órgão: restabelecimento da oferta de energia e a remoção dos metabólitos tóxicos^{32-34,51,79,80}. Entretanto, podem ser provocados distúrbios metabólicos, acentuando as lesões teciduais, se o retorno de sangue for rico em potássio e com pH ácido para a circulação sistêmica^{1,32,34,51,79,80}.

A produção da maior parte da ERO é uma consequência da passagem de elétrons através da cadeia respiratória⁸⁰⁻⁸⁴. Estes elétrons se combinam com o oxigênio (O₂) em passos intermediários da CTE, principalmente nos complexos respiratórios I e III, promovendo a redução mono eletrônica do oxigênio, produzindo assim, o radical superóxido (O₂ •-)⁷⁹⁻⁸⁴.

Estes radicais livres de oxigênio são extremamente reativos e citotóxicos, podendo agravar as lesões secundárias à I/R, causando alterações sistêmicas tanto ao fígado como aos rins, supra renal, pulmões, pâncreas, intestino e ao coração^{1,32,70,79-86}.

A ERO produzidas na mitocôndria acabam oxidando macromoléculas, tanto na própria organela, como podem ser enviadas para outros sítios intracelulares, sendo

que os primeiros alvos destes danos oxidativos são as proteínas presentes na membrana mitocondrial interna⁸⁷⁻⁹².

Nos complexos das CTE mitocondriais podem ocasionar alterações após isquemia, reduzindo a sua eficiência durante a produção do ATP e do sistema antioxidante fisiológico⁹¹⁻⁹³.

A transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPMM) está relacionada com o período de I/R, desenvolvida por diversas condições tais como: a maior produção de ERO, 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 mitocôndrial^{1,32,87,94,95}. A TPMM, torna-a progressivamente permeável a íons, a pequenas proteínas, ao suporte osmótico e prótons^{1,32,87-95}.

Com a elevação da TPMM se intensifica a disfunção da CTE, observada através da diminuição da respiração mitocondrial nos complexos da cadeia respiratória, podendo também proporcionar a redução da razão do controle respiratório (RCR), que é a razão entre (o estado estimulado III pelo estado de repouso IV), medido através das mitocôndrias isoladas ou diretamente em biópsias, após diferentes períodos de I/R^{1,32,79-82,87,95-100}.

A via metabólica na qual utiliza a energia liberada de reações de oxirredução que ocorrem na CTE na membrana interna da mitocôndria é a fosforilação oxidativa, fosforilando o ADP em ATP^{1,32,87}. Em estudos com respiração mitocondrial é demonstrado que o complexo III da CTE, quando estimulado por ADP, causa a elevação da velocidade do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias^{1,27,32,87,96}.

A utilização de oligomicina traz a respiração mitocondrial ao estado de repouso (basal), inibindo a ATPsintase, impedindo a passagem de prótons para dentro da mitocôndria^{27,32,87}.

Um desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, é o carbonylcyanide p-trifluormetoxifenilidrazona (FCCP), suspendendo a síntese de ATP por transportar prótons através da membrana interna da mitocôndria, despolarizando o potencial de membrana mitocondrial^{27,87}; estudos demonstram inibição da respiração mitocondrial, após I/R com uma inibição da velocidade de consumo de oxigênio, quando estimulado com FCCP^{27,87}.

Nos últimos anos a quantidade de estudos relacionadas à I/R do fígado vem aumentando, em que se realizam isquemia por curto ou longo período, e têm se observado graves complicações causadas por lesões secundárias à I/R^{1,14,27,30,32-36,95}.

As lesões mitocondriais e as lesões após I/R hepáticas vem sendo estudados, nos últimos anos, utilizando o isolamento das mitocôndrias ou diretamente em biópsias, avaliando a respiração mitocondrial e sua CTE em diversos órgãos como: fígado, miocárdio, músculo esquelético, rins e cérebro^{1,14,27,29,32,96,101-108}.

A avaliação mitocondrial, diretamente em biópsias hepáticas, é importante por que evita possíveis danos a estrutura mitocondrial como: o rompimento da rede estrutural ou tridimensional, a degradação de moléculas e de proteínas solúveis localizadas na matriz mitocondrial, o que pode levar a inibição da atividade das suas funções vitais, induzidos pela homogeneização mecânica e pela ação insidiosa do tampão, durante o isolamento mitocondrial^{82,108}.

É possível realizar estas avaliações sem causar esses possíveis danos por efeitos mecânicos ou químicos, nas estruturas mitocondriais, utilizando um oxígrafo de grande resolução de respirometria, em que se mede a atividade mitocondrial diretamente em biópsias^{27,87,88,96,109-111}.

Tipos diferentes de células estão presentes no fígado, tais como: as células endoteliais sinusoidais, os hepatócitos, as células de Küpffer e as células dos ductos biliares, sendo estas mais sujeitas a diferentes tipos de prejuízos induzidas pela I/R, durante as cirurgias hepáticas^{1,11,12,32}.

Durante isquemia normotérmica pode ocorrer vacuolização citoplasmática, congestão sinusoidal e/ou venosa, balonização e dependendo do tempo de isquemia, focos de necrose e infiltração gordurosa^{1,11,12,27,32,112}.

Já na isquemia hipotérmica pode ser encontrado edema celular e ruptura das células sinusoidais, mesmo com a morfologia hepatocelular aparentemente normal^{1,11,32,113}.

A restauração do fluxo sanguíneo ao tecido hepático isquêmico está associada a distúrbios circulatórios sistêmicos, a elevação da permeabilidade vascular, com o edema e desarranjo estrutural hepatocelular, a perda da viabilidade do endotélio dos sinusoides, a ativação das células de Küpffer e neutrófilos podendo, na dependência da duração da isquemia, ocasionar a morte celular^{1,32,33,114}.

Distúrbio da microcirculação como aderência de plaquetas e leucócitos, mantém o processo isquêmico, originando consequentemente uma redução do fluxo sanguíneo e a manutenção do processo de oclusão, na qual pode levar a perda da viabilidade do endotélio^{1,114,115}.

A apoptose ou morte celular programada, é um evento celular fisiológico destinado a controlar o *turnover* celular e a homeostasia celular⁹¹. Com o aumento da morte celular devido à apoptose após a I/R, pode se acarretar o desenvolvimento da falência do órgão^{1,11,32,88}.

Uma vez liberadas no citosol, estas proteínas induzem a apoptose por contribuir para a ativação de caspases (no caso de citocromo c) ou por uma via independente de caspases^{1,11,94,95}.

Com estas modificações segue-se autólise secundária à isquemia: o edema dos lisossomos, a vacuolização do retículo endoplasmático, o vazamento de enzimas e proteínas, e a descaracterização da compartimentalização celular^{70,71}. A integridade das membranas não pode ser mantida, ocasionando assim a morte celular^{70,71}.

Diante dos dados levantados e das divergências sobre os melhores métodos de clampeamento do pedículo hepático, sentimos a necessidade de estudar as lesões de I/R no fígado, procurando técnicas mais aprimoradas, tempos mais adequados para I/R total do pedículo hepático com pré-condicionamento e avaliações de I/R contínuas de imediato e em períodos mais prolongados de pós-operatório.

Até o presente não se tem, na literatura, estudo avaliando a atividade mitocondrial diretamente em biópsias de fígado, de imediato e no pós-cirúrgico tardio (28 dias), após curtos períodos de I/R total com clampeamento contínuo de 20 minutos e pré-condicionamento isquêmico de imediato com (10 minutos de I/R, seguidos de 30 minutos de I/R), do pedículo hepático em ratos Wistar, utilizando um oxígrafo de grande resolução de respirometria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito protetor do pré-condicionamento e recuperação de lesões hepáticas tardiamente, após I/R em ratos Wistar, através da respiração mitocondrial, bioquímica e histologia do fígado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do pré-condicionamento após I/R hepática em ratos Wistar, através da respiração mitocondrial, histologia do fígado e perfil hepático.

- Avaliar a atividade respiratória mitocondrial e histologia do fígado em rato Wistar, após manobra de Pringle em dois tempos de estudo: imediato e tardio.

MÉTODO

Trata-se de estudo de intervenção, cujos procedimentos foram realizados de modo aleatório, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM – Unicamp). Foram realizadas as intervenções cirúrgicas no Laboratório de Transplante Hepático – FCM – Unicamp, os exames mitocondriais foram processados no Laboratório de Bioenergética – FCM – Unicamp do NMCE, a preparação das lâminas para a análise de histologia no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) do Hospital de Clínicas (HC) Unicamp e os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica (LPC) (HC-Unicamp).

O projeto foi dividido em dois artigos e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP, sob os números de protocolos: artigo-1 (3905-1) e artigo-2 (3042-1).

ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos adultos, sadios, com peso médio de $307 \pm 44\text{g}$, com idade de oito semanas, da linhagem (***Rattus norvegicus albinus, rodentia, mammalia***). Estes foram fornecidos pelo CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - Unicamp) e mantidos no Biotério do NMCE, com máximo de cinco animais em cada gaiola, em condições ambientais controladas de luminosidades e temperatura, em ciclos diurnos de luz, recebendo dieta padrão e água ***ad libitum*** até o final da pesquisa.

ANESTESIA

Os animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos de estudo, para a intervenção cirúrgica os animais em condições de normalidade, após jejum de 8 horas. Foram pesados e anestesiados com tiopental sódico 25 mg/kg (Cristália Pharmaceutical Chemical Ltda, Campinas/SP, Brasil) intravenosa, pela veia caudal com dispositivo para infusão intravenosa estéril, 23 G e cloridrato de xylazina 30 mg/Kg (Rhobifarma Pharmaceutical Ltda, Hortolândia/SP, Brasil) intramuscular, no músculo da porção posterior das patas traseiras (músculo quadríceps).

TRICOTOMIA

Foi realizada tricotomia da parede abdominal anterior com tosquiadora Oster Golden A 5-modelo 5-5-55J (Madison, WI, EUA) e antissepsia da pele da região abdominal com solução polivinilpirrolidona iodada 10% (Johnson Wax Ltda, RJ, Brasil).

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No Laboratório de Transplante Hepático Experimental – FCM – Unicamp, os animais foram imobilizados em decúbito dorsal em prancha cirúrgica apropriada. O oxigênio foi administrado em fluxo contínuo 2,0 L/min, fornecido em campânula plástica semi-aberta favorecendo a respiração durante todo experimento. Procedeu-se a abertura do abdômen em “U”²⁶.

ARTIGO – 1: Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de estudo.

No Grupo Pré-Condicionamento – (GPC) dez animais, o pedículo hepático foi isolado e submetido ao clampeamento com micro pinça vascular por (10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão, seguidos por 30 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão), após este tempo de 80 minutos foi administrado 1,0 ml de soro fisiológico a 0,9% no peritônio (uma única vez).

No Grupo Operação Simulada – (GOS) dez animais, foram submetidos à manipulação do pedículo hepático em tempos equivalentes ao período de isquemia e reperfusão do grupo isquêmico de 80 minutos, após este tempo foi administrado 1,0 ml de soro fisiológico a 0,9% no peritônio (uma única vez).

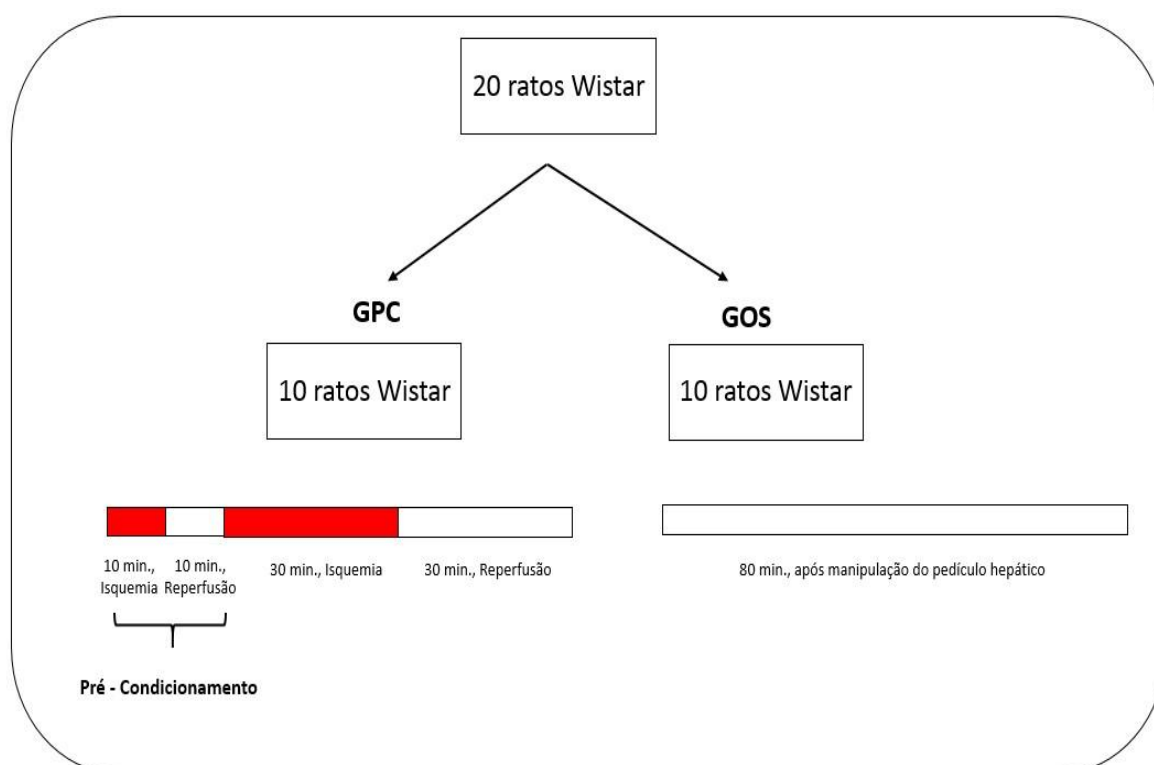


Figura 1: Fluxograma do primeiro estudo. Abreviaturas: GPC, Grupo Pré-Condicionamento; GOS, Grupo Operação Simulada; min, minuto.

ARTIGO – 2: Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de estudo: grupo imediato – (GI), grupo operação simulada imediato – (GOSI), grupo tardio – (GT) e grupo operação simulada tardio – (GOST).

Nos grupos isquêmicos (GI e GT) com nove animais em cada grupo, o pedículo hepático foi isolado e submetido ao clampeamento com micro pinça vascular por 20 minutos, após este tempo a pinça foi removida e reperfusão por 20 minutos, após 40 minutos de experimento foi administrado 1,0 ml de soro fisiológico a 0,9% no peritônio (uma única vez).

Nos grupos controles (GOSI e GOST) com cinco animais em cada grupo, foram submetidos à manipulação do pedículo hepático e um período total de 40 minutos de observação, equivalente, ao período de I/R nos demais grupos, foi administrado 1,0 ml de soro fisiológico a 0,9% no peritônio (uma única vez).

Os animais dos grupos tardios (GT e GOST), após estes tempos de isquemia e reperfusão foi realizado o fechamento da parede abdominal em plano único, contínuo, com fio de algodão 3-0, e os animais foram devolvidos às gaiolas. No 28º dia de pós-operatório, após jejum de 8 horas, os animais dos grupos GT e GOST foram anestesiados, reabertos para coleta de exames.

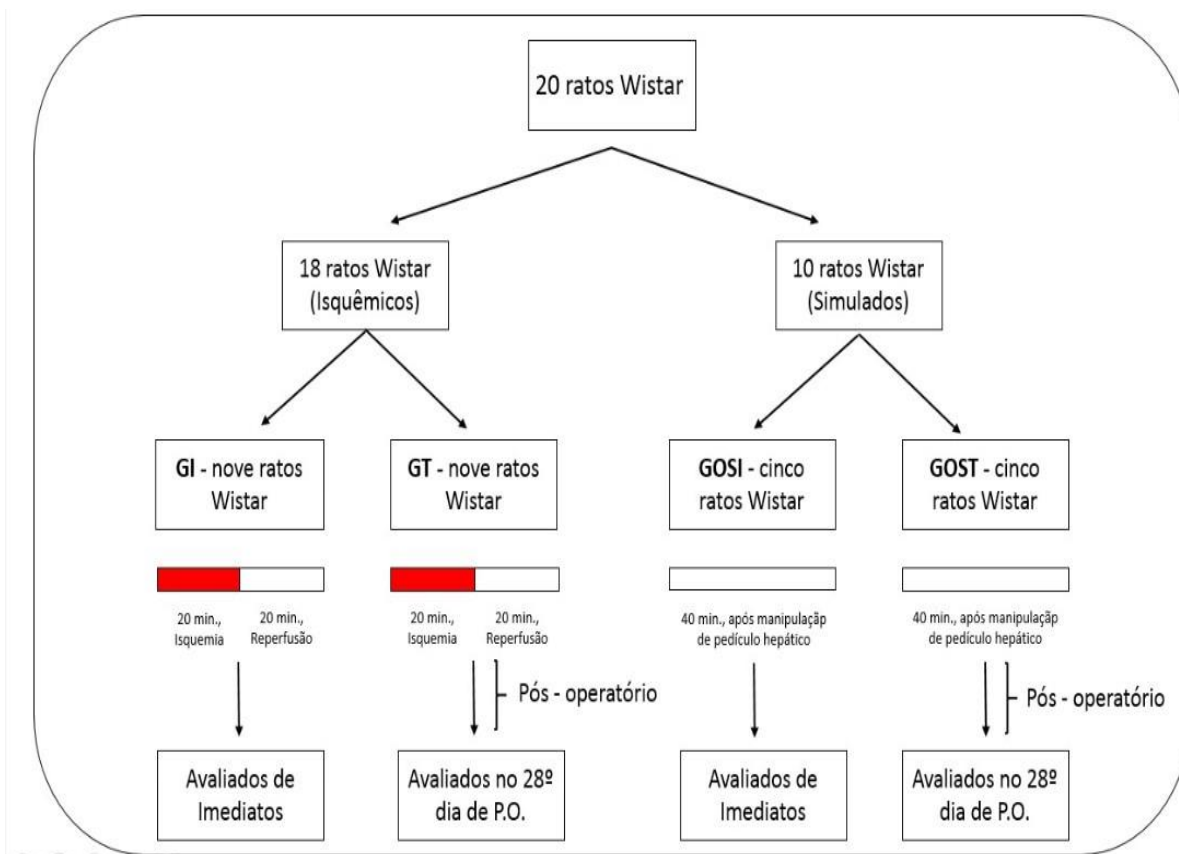


Figura 2: Fluxograma do segundo estudo. Abreviaturas: GI, Grupo Imediato; GT, Grupo Tardio; GOSI, Grupo Operação Simulada Imediato; GOST, Grupo Operação Simulada Tardio; min, minuto; P.O., Pós-Operatório.

COLETA DE EXAMES

Após cada tempo de experimento foi realizado coleta de biópsias hepáticas aleatórias do lobo esquerdo para avaliação da respiração mitocondrial, lobo médio para avaliação histológica e coleta de $\pm 3,0$ ml de sangue, por cateterismo da aorta abdominal com cateter intravenoso nº 22 protegido da luz com papel alumínio para dosagens das transaminases. Em todos os grupos o sacrifício dos animais foi realizado através de secção cardíaca, estando os animais ainda anestesiados.

AVALIAÇÃO MITOCONDRIAL

Para a avaliação mitocondrial, foi retirado do lobo esquerdo uma biópsia medindo de 2.0 x 1.0 x 2.0 cm, que foi colocado em 5ml de solução de conservação contendo (2,77 mM de CaK_2EGTA , 7,23 mM de K_2EGTA , 6,65 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mM de $\text{Na}_2\text{Pospo-creatine}$, 20 mM de Imidazole, 0,5 mM de Dithiothreitol (DDT) e 50 mM de MES) em 1,0L com (pH 7,1), em um becker e mantida a 4°C em uma caixa de isopor com gelo moído para análise mitocondrial.

Esta biópsia foi processada no Laboratório de Bioenergética – FCM – Unicamp do NMCE, onde foi utilizado um cortador automático (CHOPPER) de precisão para que sejam feitos cortes homogêneos em micros pedaços.

Para medir o consumo de oxigênio das biópsias foi utilizado um oxígrafo de grande resolução de respirometria OROBOROS® (Innsbruck, Austria), com agitador magnético e regular com temperatura 37°C.

Foram coletados aleatoriamente dois micros pedaços com peso médio de 4,0 a 6,0 mg, e inseridos nas cubas do aparelho junto com 2,1 ml de solução de meio de reação MIRO5 contendo (0,5mM de EGTA, 3mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60 mM de K-lactobionate, 20 mM de Taurine, 10 mM de KH_2PO_4 , 20 mM de HEPES, 110 mM de Sucrose e 1 g/l de BSA) em 1,0L com (pH 7,2). Em seguida a atividade respiratória mitocondrial foi analisada por meio da adição sequencial de 20 uL de Piruvato, 20 uL Malato, 20 uL de solução de 42 mM de ADP, 2 uL de solução de 1 mg/ml de oligomicina, 0,8 uL de solução 1 mM de carbonylcyanide p-Trifluormetoxifenilidrazona (FCCP) e os dados foram determinados usando o software específico do aparelho.

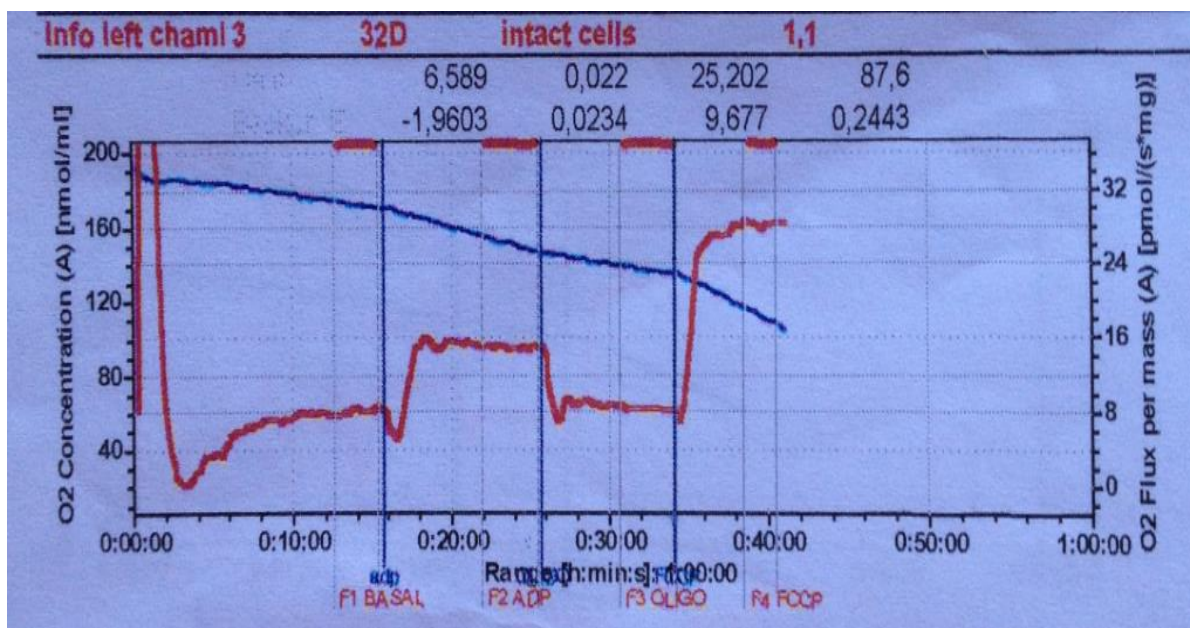


Figura 3: Gráfico utilizando o software específico do aparelho OROBOROS, durante a avaliação da respiração mitocondrial, com adição de ADP, oligomicina e FCCP, no gráfico azul mostra a diminuição da concentração de oxigênio em relação ao tempo, sendo utilizado pelas biópsias dentro da cuba, também podemos observar no gráfico vermelho o fluxo por massa de oxigênio em relação ao tempo, fornecendo a velocidade de respiração das biópsias dentro da cuba. Abreviaturas: ADP, adenosina difosfato; FCCP, carbonylcyanide p-Trifluorometoxifenilidrazona; O₂, oxigênio.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica, foi realizada no LAP-HC-Unicamp. A leitura das lâminas foi feita por um único patologista, em estudo cego. Foram retirados dois fragmentos do lobo médio do fígado de cada animal. Estes foram colocados em solução de formol a 10% por tempo máximo de 24 horas. Após este período, foi colocado em álcool 70%, e desidratado em bateria de álcool e xilol e, em seguida, incluídos em parafina e corados com Hematoxilina - Eosina (HE) e tricromo de Masson. Foram avaliados buscando-se as seguintes alterações morfológicas no fígado: congestão venosa, congestão e/ou dilatação sinusoidal, balonização, vacuolização citoplasmática e necrose focal.

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

As amostras de sangue colhidas foram centrifugadas (Centrifuga Fanem-206-R, SP, Brasil) a 2.500 rpm, durante 10 minutos, o soro foi separado em microtubos Eppendorf, mantido em gelo e encaminhado para o Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp (LPC-HC-Unicamp), para dosagens séricas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em (U/L). Estas foram realizadas por método enzimático cinético com equipamento automatizado (MODULAR P800 EVO Fabricante: Hitachi High - technologies Corporation – Tokyo; Japão).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada análise descritiva de frequência para as variáveis ordinais, o teste não paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis contínuas e o teste de Kruskal-Wallis para comparar duas ou mais amostras. O nível de significância foi de 5%. Usou-se o programa Sigma Stat versão 3.5 (Systat Software, Chicago, IL, EUA).

Nossos resultados são produtos decorrentes de nossas pesquisas, em que, já foram publicados e estão sendo demonstrados em dois artigos.

Artigo – 1



Ischemia With Preconditioning in Wistar Rats Maintains Mitochondrial Respiration, Even With Mild Hepatocellular Disturbance

R.R. Tártaro^a, G.L. Jorge^a, A.H. Dianin^a, C.A.F. Escanhoela^b, and I.F.S.F. Boin^{c,*}

^aHepatic Surgical Laboratory, Nucleus of Medicine and Experimental Surgery, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil; ^bDepartment of Pathological Anatomy, Hospital de Clínicas, State University of Campinas, Campinas, Brazil; and ^cUnit of Liver Transplantation, Hospital de Clínicas, State University of Campinas, Campinas, Brazil

ABSTRACT

Introduction. In hepatectomy or liver transplantation, preconditioning is a procedure indicated to protect the organ from ischemia-reperfusion injury (I-R).

Objective. Evaluate the effect of preconditioning after hepatic I-R in Wistar rats, through mitochondrial respiration, liver histology, and profile.

Method. Twenty male Wistar rats, weighing on average 307.1 g, were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/kg) intravenously and xylazine hydrochloride (30 mg/kg) intramuscularly. The animals were divided into 2 groups: the preconditioning group (PCG), which contained 10 animals, and the hepatic pedicle was isolated and submitted to clamping with microvascular clamp (10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion, followed by 30 minutes of ischemia and 30 minutes of reperfusion); and the simulated operation group (SOG), which contained 10 animals submitted to manipulation of the hepatic pedicle and observation for the same length of time, with blood collected for transaminase dosage measurements, and liver biopsy for evaluation of mitochondrial respiration and histologic liver analysis and after sacrificed under anesthesia. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation CEEA/UNICAMP under protocol number 3905-1.

Result. The PCG mitochondria showed the same respiration level as the SOG, when stimulated with the addition of adenosine diphosphate or carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone. In the respiratory control ratio and resting of velocity of respiration the groups behaved in a similar way. The PCG presented high aspartate and alanine transaminases ($P < .03$) and about 60% of sinusoidal congestion and venous congestion in the histologic analysis when compared with SOG.

Conclusion. We found that ischemia with preconditioning in Wistar rats can lead to mild histologic and biochemical dysfunction without leading to impairment of mitochondrial respiration.

TO control blood loss during surgery or hepatic transplantation, portal triad occlusion is used [1]. Blocking and unblocking resulting from hepatic ischemia and reperfusion (I-R) causes I-R lesion, which impairs liver regeneration, and is one of the main causes of morbidity and mortality during hepatic surgery and transplantation [2–6].

An alternative to minimize these lesions from I-R is ischemic preconditioning, in which a brief I-R period is applied before prolonged ischemic blockade [3,5,7]. In hepatectomy or

liver transplantation, ischemic preconditioning is a procedure indicated as a protector of I-R lesions [2,3,7].

However, I-R injury is a complex phenomenon and has not been clearly explained; it leads to increased production

*Address correspondence to Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, Rua Aldo Oliveira Barbosa 184, Campinas, SP Brazil, CEP 13086-030. E-mail: ilkaboin@yahoo.com

of reactive oxygen species and microvessel occlusion, compromising the mitochondrial function that is responsible for cellular bioenergetics (which can trigger cell death) [2–13]. Thus the study of mitochondrial respiration compared with enzymatic alterations and hepatic histology to evaluate ischemic preconditioning in Wistar rats is of great value.

METHODS

This intervention study's procedures were performed in a random way at the Nucleus of Experimental Medicine and Surgery (NMCE), at the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas (FCM Unicamp). The surgical interventions were performed at the Laboratory of Experimental Liver Transplantation, FCM Unicamp. The preparation of the blades for the histologic analysis was carried out in the Laboratory of Pathological Anatomy, Unicamp, and the biochemical tests were carried out at the Laboratory of Clinical Pathology of the Hospital de Clínicas of Unicamp (Laboratory of Pathological Anatomy, Unicamp). The mitochondrial tests were processed in the Bioenergetics Laboratory, FCM Unicamp of the NMCE. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation CEEA/UNICAMP under protocol number 3905-1.

Twenty healthy adult male Wistar rats with an average weight of 307 ± 43 g, aged 8 weeks, of the lineage *Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia were used. These were provided by the Center for Bioterism of Surgery, Unicamp and kept in the vivarium of the NMCE, with a maximum of 5 animals in each cage, under controlled ambient conditions of luminosities and temperature, in daylight cycles. Animals received standard diet and water ad libitum until the end of the research.

The animals were randomly divided into 2 study groups for surgical intervention of animals under normal conditions; after 8 hours fasting, animals were weighed and anesthetized with thiopental sodium 25 mg/kg (Cristália Pharmaceutical Chemical Ltda, Campinas, Brazil) intravenously, via the caudal vein with a sterile intravenous infusion device (23 gauge) and xylazine hydrochloride 30 mg/kg (Rhobifarma Pharmaceutical Ltda, Hortolândia, Brazil) intramuscularly. Anterior abdominal wall trichotomy with shear thinner Oster Golden A 5-model 5-5-55J (Madison, Wisc, United States) and abdominal skin antisepsis with 10% iodinated polyvinylpyrrolidone solution (Johnson Wax Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) were performed. The animals were immobilized in dorsal decubitus on an appropriate surgical board. The abdomen was opened by U incision [10]. Oxygen was given in a continuous flow of 2.0 L/min, supplied in a semiopen plastic bell, favoring breathing throughout the experiment. After 40 minutes of experimentation, 1.0 mL of 0.9% saline solution was administered into the peritoneum (one time only).

In the ischemic preconditioning group (PCG) of 10 animals, the hepatic pedicle was isolated and submitted to clamping with vascular microclamp for 10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion, followed by 30 minutes of ischemia and 30 minutes of reperfusion.

In the simulated operation group (SOG), the 10 animals were submitted to manipulation of the hepatic pedicle at equivalent times to the I-R period of the ischemic group.

After the experiment, blood samples were collected for transaminase dosages and hepatic biopsies of the left lobe were carried out to evaluate mitochondrial respiration and histologic analysis. In both groups the sacrifice of the animals was performed through cardiac section, with the animals still anesthetized.

Blood samples were centrifuged (Centrifuga Fanem-206-R, Sao Paulo, Brazil) at 2500 revolutions per minute for 10 minutes; the

serum was separated into microtubes, kept on ice and sent to the Laboratory of Pathological Anatomy Unicamp, for serum dosages of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). These were performed by a kinetic enzymatic method with automated equipment (Modular P800 Evo Manufacturer: Hitachi High, Technologies Corporation, Tokyo, Japan).

For the histologic analysis of the liver stained in hematoxylin and eosin and Masson's trichrome, the reading of the slides was performed by a single pathologist in a blind study.

For the mitochondrial evaluation, a biopsy measuring $2.0 \times 1.0 \times 2.0$ cm was taken from the left lobe, which was placed in 5 mL of preservation solution containing 2.77 mmol/L CaK_2 EGTA, 7.23 mmol/L K_2 EGTA, 6.65 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mM Na_2 pospho-creatine, 20 mmol/L imidazole, 0.5 mmol/L dithiothreitol and 50 mmol/L MES in 1.0 L with pH 7.1 in a beaker and maintained at 4°C in a Styrofoam cooler with crushed ice. This biopsy was processed using a precision automatic cutter (Chopper) to make homogenous cuts in microscopic pieces.

To measure the oxygen consumption of the biopsies, a high-resolution Oroborus (Innsbruck, Austria), with magnetic stirrer and regular temperature of 37°C was used. Two randomly chosen samples were collected (mean weight, 4.0 and 6.0 mg) and inserted into the vats of the apparatus together with 2.1 mL of MIRO5 reaction medium solution containing 0.5 mmol/L EGTA, 3 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60 mmol/L K-lactobionate, 20 mmol/L taurine, 10 mmol/L KH_2PO_4 , 20 mmol/L HEPES, 110 mmol/L sucrose, and 1 g/L bovine serum albumin in 1.0 L with pH 7.2. Then mitochondrial respiratory activity was analyzed by the sequential addition of 20 μL of pyruvate, 20 μL malate, 20 μL of 42 mmol/L adenosine diphosphate (ADP) solution, 2 μL of 1 mg/mL oligomycin solution, and 0.8 μL of 1 mmol/L solution of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP).

Descriptive analysis was used for ordinal variables and the nonparametric Mann-Whitney test for continuous variables. The level of significance was 5%. The program Sigma Stat version 3.5 (Systat Software, Chicago, Ill, United States) was used.

RESULTS

No deaths were observed during the experiment. In the mitochondrial evaluation, the PCG had the same level of respiration when compared with SOG, both when stimulated with the addition of ADP and with the addition of FCCP. In the resting state with addition of oligomycin, there was also no significant difference in the velocity of mitochondrial respiration between PCG and SOG. The respiratory control as the ratio FCCP to oligomycin did not show a significant difference ($P > .05$) when the groups were compared (Fig 1). The serum values of AST and ALT showed significant increases of ($P < .03$) in PCG when compared with the SOG (Table 1).

Histologic evaluation of the liver of the PCG rats showed that 60% of the animals had variable degrees of sinusoidal congestion and venous congestion, but these changes were not observed in the SOG (Fig 2).

DISCUSSION

In this study we evaluated the effect of preconditioning after hepatic I-R through mitochondrial respiratory activity, biochemical evaluation, and liver histology in Wistar rats.

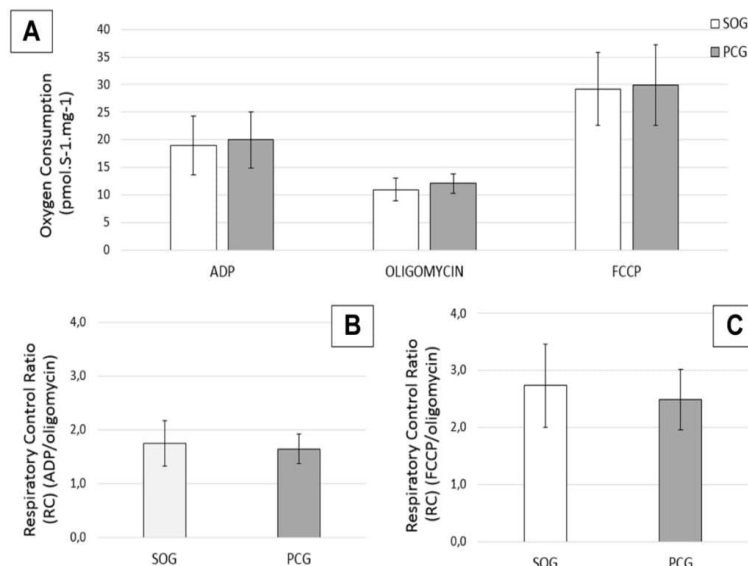


Fig 1. (A) In the mitochondrial evaluation, PCG had the same level of respiration when compared with SOG, both when stimulated with addition of ADP and with addition of FCCP. In the resting state with addition of oligomycin, there was no significant difference ($P > .05$) in the mitochondrial respiration rate between groups. (B) Respiratory control ratio, ADP to oligomycin, showed no significant difference ($P > .05$) between the groups. (C) The ratio of FCCP to oligomycin did not present significant difference ($P > .05$) between groups. Statistical analysis: Mann-Whitney test. Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazine; PCG, preconditioning group; SOG, simulated operation group.

The present study demonstrated a protective effect of ischemia after preconditioning of the hepatic pedicle in mitochondrial respiration, preserving mitochondrial activity, signaling that respiration levels were not compromised or inhibited after the ischemic procedure. Recent works demonstrate that both partial ischemic preconditioning of 70% of the liver, as the remote, applied in circumflex branches of the heart or lower limbs, act as protectors for I-R lesions, attenuating the inhibition of mitochondrial function [3,11–13].

We concluded in previous studies in the immediate evaluation that after the induction of I-R of the hepatic pedicle, this protection was not conferred, because of an inhibition and impairment of mitochondrial respiration, thereby reducing oxidative phosphorylation [10,14]. This fact can be explained by the continuous and intermittent immediate methods of hepatic I-R, which do not grant a release of antioxidants as efficient as the ischemic preconditioning method, in which it protects mitochondrial activity.

With the production of antioxidants, there is an increase of antioxidant activity in hepatocytes and a decreased production of reactive oxygen species, preventing the activation of the apoptotic cascade and occlusion of microvessels [3,11,13]. All these effects lead to protection of mitochondrial function.

It needs to be recalled that respiratory states III and IV mean respectively the ability of mitochondrial oxidative phosphorylation and respiration at rest [10,15].

Both the induction of total ischemia of the hepatic pedicle, continuous as well as intermittent, lead to a decrease of state III demonstrating a significant decrease of mitochondrial respiration in the 2 experimental conditions [10,14]. When we performed the ischemic preconditioning, we did not find this effect in our results, indicating that the oxidative phosphorylation capacity was not inhibited but preserved.

Our results showed no change in the IV status between the groups: preconditioning and control after hepatic I-R. Previous work has demonstrated this same event, after I-R in continuous and intermittent methods in Wistar rats [10,14,15]. Thus, regardless of the I-R method used, mitochondrial respiration in the resting state maintains similar levels.

Table 1. Liver Profile Test and Histologic Changes Observed Between Groups

	SOG	PCG	P
Laboratory tests			
AST (IU/L)	129.2 ± 38.82	830.2 ± 595.6	.03
ALT (IU/L)	34.0 ± 15.58	491.6 ± 375.0	.03
Histologic aspects			
Sinusoidal congestion (%)	Absent	60	<.05
Congestion venous (%)	Absent	60	<.05

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; PCG, preconditioning group; SOG, simulated operation group.

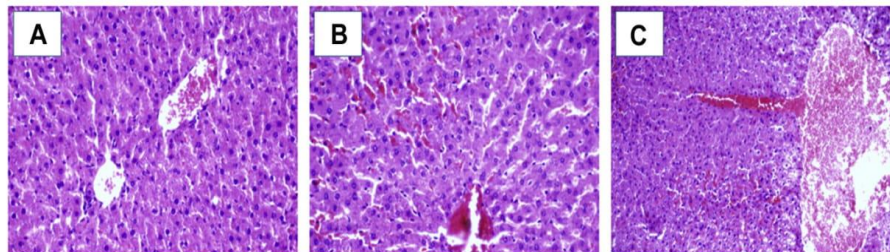


Fig 2. (A) Simulated operation group: portal space and central vein (hematoxylin and eosin, $\times 200$). (B) Preconditioning group: sinusoidal congestion and venous congestion (hematoxylin and eosin, $\times 200$). (C) Preconditioning group: venous congestion and lobular center vein (hematoxylin and eosin $\times 100$).

The respiratory control that is the ratio between respiratory states III and IV [10,14,15] was shown to be uniform among the groups studied, evidencing a protection to mitochondria after PCG. As described in the literature, the inhibition of mitochondrial activity was observed after evaluations with both continuous and intermittent methods of liver I-R, interfering directly in respiratory control [10,14,15].

Thus the ability of a tissue to resist hypoxia depends on its efficiency in maintaining a nonoxidative glycolytic metabolism, and forced mitochondrial activity would result in mitochondrial-induced cell death [6–9]. In this way we see that ischemic preconditioning of the hepatic pedicle promotes favorable conditions for protection of mitochondrial activity of hepatocyte cells during the I-R period.

The enzymatic changes (ALT and AST) are considered to be sensitive markers of hepatocellular damage; they were observed shortly after the surgical procedure and were directly associated with the time of hypoxia suffered by the organ and reperfusion of the remaining parenchyma [10,16]. Although ALT is found only in the cellular cytoplasm, AST is a cytosolic and mitochondrial enzyme [16,17].

In our study, ischemic preconditioning demonstrated a significant enzymatic elevation compared with the controls. Both the method of continuous vascular occlusion along with intermittent occlusion end up increasing intensively the concentrations of these enzymes, inducing a more deleterious effect [10,16]. However, studies have shown that ischemic preconditioning leads to an increase of more moderate form, minimizing the damage suffered after I-R of the organ [10,16,17]. Our results are consistent with the literature indicating this protective effect.

In normothermic ischemia, different types of cellular degeneration may occur: cytoplasmic vacuolization, sinusoidal congestion, inflammation, and, depending on the time of ischemia, foci of necrosis and fatty infiltration [10,15,18]. Evidence of necrosis is an irreversible sign of hepatocellular damage in contrast to inflammation, vacuolization, and sinusoidal congestion, in which they may be reversible.

Evaluations after total I-R of the hepatic pedicle in rats, with continuous and intermittent methods, resulted in

increased histopathologic changes, ranging from an intense area of congestion of the venous branch, sinusoidal congestion, or vacuolization to necrosis [10,15,18,19]. In this work, histopathologic changes were confirmed after ischemic preconditioning; however, the appearance of these lesions, although statistically significant, indicated mild sinusoidal congestion and venous congestion of lower intensity.

Nevertheless, preconditioning preserved large areas of normal liver architecture when compared with continuous I-R, and is considered a protector of I-R lesions, minimizing histopathologic alterations [15,18,19]. Our results are consistent with studies of ischemic preconditioning indicating a protective effect.

In conclusion, our findings demonstrated that total ischemia with preconditioning in Wistar rats can lead to mild histologic and biochemical dysfunction without leading to impairment of mitochondrial respiration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Bioenergetics Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; Anatomy Pathological Laboratory, Hospital of Clinics, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. Support came from the School of Corporate Education of Unicamp and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel.

REFERENCES

- [1] Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997;226:704–13.
- [2] Rudiger HA, Koo J, Kang KJ, Sindram D, Hans MR, Pierre AC. Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235:400–7.
- [3] Prieto I, Monsalve M. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning. *Redox Biol* 2017;12:1020–5.
- [4] Reiniers MJ, van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:1119–42.

- [5] Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *World J Gastroenterol* 2004;10:1934-8.
- [6] Chu MJ, Premkumar R, Hickey AJ, Jiang Y, Delahunt B, Phillips AR, et al. Steatotic livers are susceptible to normothermic ischemia-reperfusion injury from mitochondrial Complex-I dysfunction. *World J Gastroenterol* 2016;22:4673-84.
- [7] Vesa A, Henri H, Fredrik Y, Johanna H, Tuomas A, Tatu J. Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials. *Scand Cardiovasc J* 2016;50:355-61.
- [8] Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1966;41: 445-502.
- [9] Hand SC, Menze MA. Mitochondria in energy-limited states: mechanisms that blunt the signaling of cell death. *J Exp Biol* 2008;211:1829-40.
- [10] Tártaro RR, Jorge GL, Leonardi MI, Escanhoela CAF, Leonardi LS, Boin IFSF. No protective function found in Wistar rats submitted to long ischemia time and reperfusion after intermittent clamping of the total hepatic pedicle. *Transplant Proc* 2015;47:1038-41.
- [11] Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, Zielinska M. Ischaemic preconditioning—current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv Med Sci* 2017;62: 307-16.
- [12] Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol* 2013;9:1683-98.
- [13] Rolo AP, Teodoro JS, Peralta C, Rosello-Catafau J, Palmeira CM. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATP synthase and mitochondrial permeability transition. *Transpl Int* 2009;22:1081-90.
- [14] Jorge GL, Tartaro RR, Escanhoela CAF, Boin IFSF. Later evaluation of ischemia and reperfusion by the Pringle Maneuver in Wistar rats, demonstrating that hepatic lesions can be reversible. *Transplant Proc* 2017;49:898-901.
- [15] 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.
- [16] 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;12:250-61.
- [17] Radojkovic M, Stojanovic M, Stanojevic G, Radojkovic D, Gligorijevic J, Ilic I, et al. Ischemic preconditioning vs adenosine vs prostaglandin E1 for protection against liver ischemia/reperfusion injury. *Braz J Med Biol Res* 2017;50:e6185.
- [18] 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;27:196-200.
- [19] Wang Y, Shen J, Xiong X, Xu Y, Zhang H, Huang C, et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury via heme oxygenase-1-induced autophagy. *PLoS One* 2014;9:e98834.

Artigo – 2



Later Evaluation of Ischemia and Reperfusion by the Pringle Maneuver in Wistar Rats, Demonstrating That Hepatic Lesions Can Be Reversible

G. de Lourdes Jorge^a, R. dos Reis Tártaro^a, C.A. Fazzio Escanhoela^b, and I.F.S.F. Boin^{a,*}

^aHepatic Surgical Laboratory, Nucleus of Medicine and Experimental Surgery, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil; and ^bDepartment of Anatomic Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

ABSTRACT

Objective. There has been much research on hepatic ischemia and reperfusion by means of short or longer interruption of the portal triad. The aim of this work was to evaluate the mitochondrial respiratory activity and liver histology at 2 different times after the Pringle maneuver.

Methods. Twenty-eight male Wistar rats, weighing ~308 g, with histologic and mitochondrial study; immediate ischemic group (IIG; 40 minutes; 9 animals) and late ischemic group (LIG; 28 days; 9 animals). The rats were anesthetized and underwent a U-incision in the abdomen. In a simulated operation, manipulation of the hepatic pedicle was performed (5 animals immediate [ISG] and 5 late [LSG]). The hepatic pedicle was clamped for 20 minutes of ischemia followed by 20 minutes of reperfusion. The animals were killed under anesthesia.

Results. Mitochondria when stimulated by adenosine diphosphate or carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone had a significant respiratory reduction ($P < .001$). The respiratory control ratio in the LIG was altered ($P < .02$) compared with IIG. In the resting state, there was no change in the velocity of respiration between ischemic groups. Histopathologic findings showed 55.5% sinusoidal dilatation in IIG and 66.6% in LIG; 77.7% ballooning in IIG and 55.5% in LIG; and 11.1% focal necrosis in both IIG and LIG.

Conclusions. The oxidative phosphorylation system recovered with improvement in mitochondrial respiration; however, morphologic recovery was associated with the type and intensity of injury.

TOTAL hepatic pedicle clamp is used in liver procedures; however, early or later evaluation in the Wistar rat portal triad has shown serious complications [1–4]. Liver ischemia followed by reperfusion [1–4] leads to a complex cascade of events, such as loss of power, ionic imbalance of hemostasis, production of reactive oxygen species (ROS), and cell death [5–7]. Ischemia-reperfusion (I/R) has a critical role for the mitochondria, because it goes through major changes that may contribute to organ malfunctions [7,8].

The aim of the present study was to evaluate the mitochondrial respiratory activity and liver histology at 2 different times after the Pringle maneuver.

METHODS

This research was developed at the Hepatic Experimental Laboratory/Nucleus of Experimental Medicine and Surgery, State University of Campinas. The Ethics Committee on Animal Use approved the project (CEUA-Unicamp no 3042-1).

Twenty-eight healthy adult male Wistar rats were used, with an average weight of 308 ± 43 g and aged 8 weeks. For the surgery, the animals were anesthetized with the use of sodium thiopental

*Address correspondence to Ilka F.S.F.a. Boin, Rua Aldo de Oliveira Barbosa 184, Campinas, SP, Brazil CEP 13086-030. E-mail: ilkaboin@yahoo.com

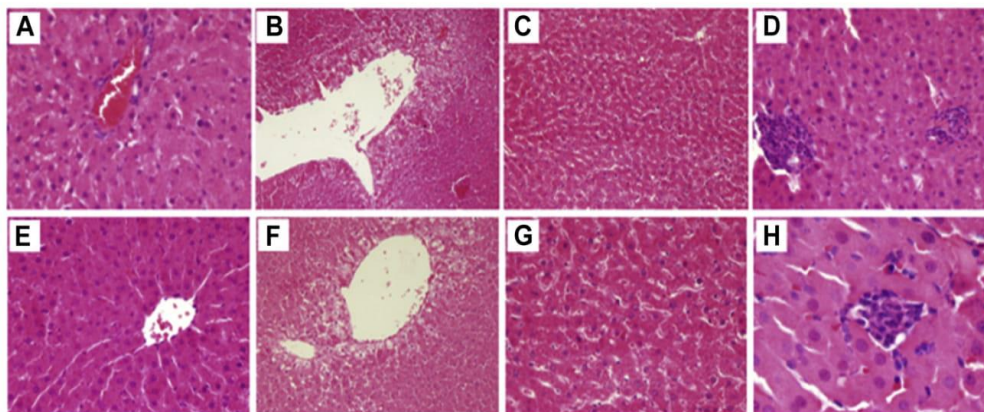


Fig 1. Liver alterations observed. (A) ISG (HE, $\times 320$). (B) IIG, ballooning (HE, $\times 160$). (C) IIG, sinusoidal dilation (HE, $\times 160$). (D) IIG, focus of necrosis (HE, $\times 220$). (E) LSG (HE, $\times 320$). (F) LIG, ballooning (HE, $\times 160$). (G) LIG, sinusoidal dilation (HE, $\times 320$). (H) LIG, focus of necrosis (HE, $\times 400$). Abbreviations: HE, hematoxylin and eosin; ISG, intermittent sham group; IIG, intermittent ischemic group; LSG, late sham group; LIG, late ischemic group.

(25 mg/kg) and xylazine hydrochloride (30 mg/kg). The rats were weighed and subjected to anesthesia, and after U-incision laparotomy [9] the hepatic pedicle was isolated and clamped with the use of a microvascular clamp (after 20 minutes of ischemia and 20 minutes of reperfusion) or manipulated in the sham-operated control animals.

The animals that were evaluated immediately after the ischemic procedure were in the immediate ischemic group (IIG) and the immediate sham group (ISG). Those who were evaluated later, on day 28, were in the late ischemic group (LIG) and the late sham group (LSG). Liver biopsies from the middle and left lobe were collected at these times for histologic and mitochondrial assessment. In all groups, killing the animals was performed by means of cardiac section, with the rats still under anesthesia.

Histologic analysis of liver tissue samples of the middle lobe were fixed in hematoxylin-eosin and Masson trichrome. Histologic analysis observed sinusoidal dilation, ballooning, and focal necrosis as observed by a single liver pathologist (blinded).

For the mitochondria evaluation, left lobe biopsy of $2.0 \times 1.0 \times 2.0$ cm was performed, which was placed in 5 mL conservation solution, following the method already standardized in our service [10]. The biopsy was processed with the use of an autocutter for homogeneous cuts. A high-resolution respirometry oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria) was used to measure the oxygen consumption of the biopsies, with magnetic stirrer and temperature controlled at 37°C , following the method already standardized in our service [10].

Descriptive analysis and Mann-Whitney nonparametric test were performed with the use of Sigma Stat software, version 3.5 (Systat Software, Chicago, Illinois). The significance level was 5%.

RESULTS

No death was observed during the experiment. On the liver histologic evaluation many alterations were observed (Fig 1). No change in the sham groups was observed. The mitochondria of the ischemic groups (IIG and LIG), when stimulated by adenosine diphosphate (ADP) or

carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), showed significant decrease of mitochondrial respiratory state compared with the sham groups ($P < .001$; Fig 2). The respiratory control ratio (RCR) in the IIG, compared with the ISG, showed significant difference ($P < .02$); and the RCR of the LIG, compared with LSG, showed no difference (Fig 2).

DISCUSSION

In this study, mitochondrial respiratory activity and histology of the liver after the Pringle maneuver in Wistar rats were assessed at 2 time points: immediate and late. This study demonstrated that there were no deaths after 20 minutes of ischemia, despite the hepatic lesions.

Experiments with immediate evaluation after I/R in rats by means of the Pringle maneuver for a long duration indicate lesions in 100% of animals, such as intense area of congestion of the venous branch, sinus congestion, or vacuolization and necrosis [10,11]. The present study confirmed the occurrence of ballooning lesions, sinusoidal dilation, and focal necrosis in 100% of the animals in IIG and 88% in LIG, changes that were not observed in the control groups.

Some authors have reported reperfusion injury associated directly with mitochondrial dysfunction and increased ROS [10,12–14]. The exact mechanisms are still being debated and are not fully known. Mitochondria are essential to the sustainability and are responsible for producing most of the cellular adenosine triphosphate (ATP), so any interference of mitochondrial function may disrupt normal bioenergetics and lead to cell death [10,12–14].

Studies claim that after the induction of I/R, an inhibition of the respiratory chain in mitochondria is generated owing to oxidative stress with an elevation of the generation of

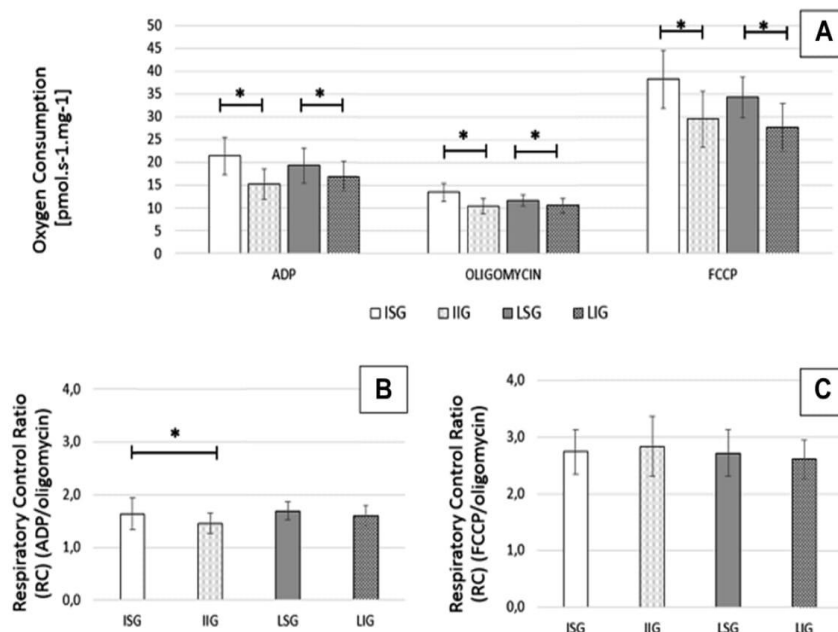


Fig 2. (A) Mitochondria of IIG and LIG, when stimulated with the use of ADP, showed inhibition of respiration of, respectively, 30% and 17%, and when stimulated with the use of FCCP showed inhibition of respiration of, respectively, 23% and 19%, compared with control groups (ISG and LSG; $P < .001$). In the mitochondrial resting state, when added oligomycin, the velocity of respiration was inhibited in the ischemic groups compared with their respective control groups. (B) Stimulated with the use of ADP, the RCR in IIG was different compared with ISG ($P < .02$); the RCR of LIG compared with LSG showed no difference. (C) Stimulated with the use of FCCP/oligomycin, the RCR showed no difference. Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; RCR, respiratory control ratio; others as in Fig 1. * $P < .05$.

ROS, which can lead to a dysfunction and cell death [7,10,15]. The results in the immediate evaluation showed inhibition in the ischemic group, demonstrating that there is a decrease in consumption of oxygen by mitochondria, thus compromising the mitochondrial respiration.

LIG animals showed an inhibition of the respiratory chain when stimulated with the use of ADP or FCCP, tending to normalization of mitochondrial respiration, in contrast to animals evaluated immediately. Some authors showed that after I/R hepatic oxidative phosphorylation can be impaired [7,10,15]. Although the immediate study corroborates those data, in the late group there was a recovery of the mitochondrial oxidative phosphorylation system.

CONCLUSION

In this study, the oxidative phosphorylation system recovered with improvement in mitochondrial respiration; however, morphologic recovery was associated with the type and intensity of injury.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Bioenergetics Laboratory of the Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University

of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil, and the Anatomy Pathologic Laboratory, State University of Campinas.

REFERENCES

- [1] Giovanardi RO, Giovanardi HJ, Bozetti M, Garcia R, Lima LP. Intermittent total pedicular clamping in hepatic resections in noncirrhotic patients. *Hepatology* 2002;49:764-9.
- [2] Verdonk RC, Buis CI. Haagsma complications after liver transplantation: a review. *Scand J Gastroenterol* 2006;243:89-101.
- [3] Zhang J, Dawson VL, Dalsen TM. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994;263:687-9.
- [4] Szabo 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;78:1051-63.
- [5] 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;38:59-66.
- [6] Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:718-24.
- [7] Striffler G, Tuboly E, Szél E, Kaszanyi E, Cao C, Kaszaki J, et al. Inhaled methane limits the mitochondrial electron transport chain dysfunction during experimental liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2016;11:e0146363.
- [8] 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;91:456-64.

- [9] Jorge GL, 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.
- [10] Tártaro RR, Jorge GL, Leonardi MI, Escanhoela CA, Leonardi LS, Boin IFSF. No protective function found in Wistar rats submitted to long ischemia time and after intermittent clamping of the total hepatic pedicle. *Transplant Proc* 2015;47:1038-41.
- [11] Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013;59:1094-106.
- [12] 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;114:3-6.
- [13] Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 2008;321(5895):1493-5.
- [14] Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278:36027-31.
- [15] 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;28(6):18317.

DISCUSSÃO GERAL

O procedimento cirúrgico de I/R se faz necessário no dia a dia dos cirurgões, sendo amplamente utilizado durante os transplantes e cirurgias na qual requer a interrupção do fluxo sanguíneo ao órgão. Pringle descreveu a manobra cirúrgica do clampeamento do pedículo hepático, na qual é utilizada nos transplantes e grandes cirurgias hepáticas, sendo ainda a disfunção do enxerto, importante causa de morbidade e mortalidade pós-operatória^{1-17,27-34}.

Reproduzimos no rato Wistar, dois métodos experimentais de I/R total do pedículo hepático: o pré-condicionamento e o clampeamento contínuo, em ambos a veia porta, artéria hepática e ducto biliar foram pinçados juntos, variando apenas o tempo e a quantidade de clampeamento, para possíveis estudos deste fenômeno ainda pouco compreendido. Nosso trabalho avaliou o efeito do pré-condicionamento, após I/R hepática em ratos Wistar, através da respiração mitocondrial, histologia do fígado e as enzimas (AST/ALT). Após manobra de Pringle avaliamos dois tempos: imediato e tardio, a atividade respiratória mitocondrial e histologia do fígado.

Afim de manter a anestesia, analgesia e o bem-estar dos animais durante o procedimento cirúrgico, anestesiámos os animais com tiopental sódico, um anestésico de ação rápida e cloridrato de xylazina para o relaxamento muscular e analgesia, injetados intravenosa e intramuscular, respectivamente. Este procedimento foi escolhido por ser rápido, menos invasivo e padronizado em nossos estudos, facilitando o controle do anestésico que foi eficiente para anestesia e analgesia, preservando assim a integridade dos animais^{26,27}.

Após a anestesia, para favorecer e manter a respiração adequada dos animais, administramos oxigênio num fluxo contínuo, fornecido em campânula plástica semi-aberta^{26,27}, sendo que durante todos os procedimentos operatórios não obtivemos óbito durante a operação, e nem no pós-operatório.

O método de abertura em “U”²⁶, nos proporcionou visão ampla de todo campo operatório, localização e manuseio do pedículo hepático, inserção da micro pinça vascular, observação da mudança de cor durante a revascularização do fígado, abertura e fechamento da parede abdominal nos tempos de I/R de cada grupo e coleta dos exames. Evitou-se assim, sangramentos, diminuindo a aderência e possíveis lesões com a utilização de afastadores. Estas causas foram consideradas como um dos principais riscos de mortalidade em modelos experimentais^{63,116}.

O método pré-condicionamento é visto como protetor hepático por causar menos danos ao órgão em comparação com clampeamento contínuo^{14,23,29-36}. Sendo assim, o pré-condicionamento foi o método de escolha na realização deste estudo de I/R hepática no rato.

Com a finalidade de avaliar a preservação da respiração mitocondrial foi usado o equipamento de alta resolução de respirometria (OROBOROS®), nas avaliações da respiração das mitocôndrias^{27,87}.

Este método de avaliação da respiração mitocondrial foi utilizado também para os grupos de estudo de clampeamento contínuo e adotamos um tempo de I/R menor e as avaliações em dois grupos diferentes: imediato e tardio.

Alguns autores associam a lesão de I/R diretamente com à disfunção mitocondrial e aumento de ERO^{1,27,28,32,33,79-82,117}; seus mecanismos exatos ainda não

são totalmente conhecidos e são debatidos. As mitocôndrias são fundamentais para a sustentabilidade celular e responsáveis pela produção da maior parte do ATP celular e qualquer interferência da função mitocondrial pode interromper a bioenergética normal, levando à morte celular.

Constatamos que o pré-condicionamento pode ter contribuído para proteção da respiração mitocondrial e apresentou o consumo de oxigênio normais no estado III e IV, após o procedimento de I/R do fígado.

Atenta-se ao fato que o estado respiratório III significa a capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial e consequente produção de energia (fosforilação do ADP em ATP)^{27,32,53-56,112}. No nosso trabalho com pré-condicionamento a produção de energia foi mantida, quando estimulada por ADP, e quando estimulado por FCCP não mostrou inibição da respiração, com níveis semelhantes ao controle no consumo de oxigênio.

O estado respiratório IV é a respiração no estado basal, responsável pela geração e manutenção do potencial de membrana mitocondrial e está relacionado com a integridade da membrana mitocondrial^{27,32,53-56}. No estudo com o pré-condicionamento verificamos que a integridade da membrana mitocondrial foi mantida no estado IV, por apresentar níveis de respiração semelhantes ao controle.

O controle respiratório (CR) é a razão entre os estados respiratório III e IV^{27,32,53-56}. Comprovamos que o controle respiratório entre os grupos controle e de isquemia com pré-condicionamento, mostrou consistência nos resultados, similares entre si. Nossos dados são condizentes com trabalhos recentes em que demonstram resultados semelhantes com o pré-condicionamento isquêmico parcial 70% do fígado

e quando remoto, aplicados em ramos circunflexos do coração ou de membros inferiores, atuando como protetores na respiração mitocondrial^{42,54-56}.

Quando se usou o clampeamento contínuo do pedículo hepático, não se repetiu as análises no período imediato, que esse efeito protetor não ocorreu; houve uma diminuição do consumo do oxigênio, com uma inibição de 30% quando adicionado ADP e 23% com FCCP, demonstrando uma diminuição da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, menor produção energética.

Observamos também que no estado IV, o grupo isquêmico apresentou valores menores do consumo de oxigênio em relação ao grupo controle, indicando uma alteração da integridade da membrana mitocondrial. No controle respiratório também apresentou diferença entre os grupos estudados, nos revelando danos na cadeia respiratória. Nossos resultados se assemelham com a literatura em que estas inibições são relatadas, após avaliações imediatas tanto com método contínuo quanto intermitentes de I/R do fígado, interferindo diretamente na respiração mitocondrial^{27,39,109}.

Quando avaliamos os animais no período tardio, observamos uma inibição da respiração quando estimulado tanto por ADP como por FCCP quando comparado ao controle, mas quando comparado ao grupo isquêmico imediato, observamos uma diminuição desta inibição de 30% para 17% quando se estimulou com ADP e de 23% para 19% quando estimulado por FCCP, sendo assim, percebemos que o pós-operatório favoreceu essa tendência à normalização da respiração mitocondrial, pois estes apresentaram uma redução dos níveis de inibição em relação aos animais isquêmicos avaliados de imediato.

Quando se avaliou o estado IV observou-se que o grupo isquêmico apresentou valores menores do consumo de oxigênio em relação ao grupo controle indicando uma alteração da integridade da membrana mitocondrial ainda presente.

O CR apresentou semelhança quando comparado ao controle, revelando consistência em afirmar que ocorreu uma recuperação da fosforilação oxidativa no grupo isquêmico tardio. Sendo que estes dados não estão citados na literatura com este pós-operatório.

Na produção de antioxidante ocorre diminuição da produção de ERO, prevenindo a ativação da cascata apoptótica e a oclusão de micro vasos, sendo que esses efeitos levam a proteção da função mitocondrial^{42,54-56}.

Pode ter ocorrido uma liberação de antioxidantes menos eficiente quando utilizamos o método contínuo no procedimento de I/R. Quando se aplicou o método do pré-condicionamento, observamos uma proteção da atividade respiratória mitocondrial.

Sendo assim, a capacidade de um tecido em resistir à hipóxia depende da sua eficiência em manter um metabolismo não oxidativo glicolítico, e a atividade mitocondrial forçada resultaria em morte celular induzida pela mitocôndria^{45,52-53}.

Deste modo, vemos que o pré-condicionamento promoveu condições favoráveis à proteção da atividade mitocondrial dos hepatócitos durante o período de I/R de 30 minutos e que o tempo pós-operatório no grupo tardio, foi suficiente para iniciar uma recuperação do sistema de fosforilação oxidativa, após uma inibição da respiração mitocondrial.

Na I/R pode ocorrer diferentes tipos de degeneração celular: vacuolização citoplasmática, congestão sinusoidal, inflamação e dependendo do tempo da isquemia, focos de necrose e infiltração gordurosa. Indícios de necrose é um sinal irreversível de lesão hepatocelular em contraste com inflamação, vacuolização e congestão sinusoidal, nas quais podem ser reversíveis^{27,32,64}.

Observamos que após o pré-condicionamento isquêmico, houve alterações histopatológicas, entretanto, estas lesões apesar de serem estatisticamente significativas, foram de leve intensidade de congestão sinusoidal e congestão venosa.

O pré-condicionamento preserva grandes áreas da arquitetura normal do fígado quando comparado à I/R contínua, sendo considerado um protetor das lesões de I/R, minimizando alterações histopatológicas^{32,64,118}. Nossos resultados são consistentes com estes estudos de pré-condicionamento isquêmico, indicando um efeito protetor.

Como mostra a literatura, avaliações após I/R total do pedículo hepático em ratos, com método contínuo e intermitente, apresentam aumento das alterações histopatológicas, variando desde intensa área de congestão do ramo venoso, congestão sinusoidal e/ou vacuolização, chegando até a apresentar necrose^{14,27,32,64,118,119}.

Experiências anteriores com avaliações imediatas após I/R em ratos pela Manobra de Pringle por tempo prolongado, apontam lesões em 100% dos animais com: intensa área de congestão do ramo venoso, congestão sinusoidal e/ou vacuolização e necrose^{14,27}.

Neste estudo, nas avaliações dos grupos contínuos, confirmam o aparecimento de lesões de balonização ou dilatação sinusoidal ou focos de necrose em 100% dos animais do grupo isquêmico imediato e 88% no grupo isquêmico tardio, sendo que estas alterações não foram constatadas nos grupos controles, corroborando com a literatura.

As alterações enzimáticas (ALT/AST), são consideradas marcadores sensíveis de dano hepatocelular e observadas logo após o procedimento cirúrgico, ou durante o pós-cirúrgico, estando diretamente associada com o tempo de hipóxia sofrida pelo órgão e da reperfusão do parênquima remanescente, enquanto a ALT é encontrada unicamente no citoplasma celular a AST é uma enzima citossólica e mitocondrial^{26-28,60}.

Já foi comprovado que tanto o método de oclusão vascular contínuo, quanto intermitente acabam elevando de forma mais intensa as concentrações destas enzimas, induzindo um efeito deletério mais acentuado, entretanto, estudos demonstram que o pré-condicionamento isquêmico pode levar a um aumento de forma mais moderada, minimizando os danos sofridos após I/R do órgão^{27,28,60}.

Comprovamos o efeito protetor no método de pré-condicionamento observando a elevação moderada das enzimas, sendo coerentes com a literatura.

Houve 100% de sobrevivência dos animais em nossos estudos estão, portanto, relacionado aos procedimentos adotados em nossa pesquisa, comprovamos que o pré-condicionamento agiu de forma protetora quando realizamos clampeamento do pedículo hepático, atenuando as lesões de I/R, quando comparado a outros métodos de I/R contínuo e intermitente.

Outra descoberta é que o tempo de pós-operatório, se mostrou viável para estudos de I/R em rato Wistar, possibilitando a recuperação da fosforilação oxidativa, na qual pode desencadear novas oportunidades de estudos, na busca de respostas aos mecanismos da lesão de I/R e seus efeitos, tanto ao fígado como para outros órgãos.

CONCLUSÃO

Constatamos que a isquemia com pré-condicionamento em ratos Wistar, pode levar à leve distúrbios histológicos e bioquímicos, porém sem o comprometimento da respiração mitocondrial.

A avaliação tardia com uso da manobra de Pringle em ratos Wistar, mostrou recuperação do sistema de fosforilação oxidativa e melhora da respiração mitocondrial, já a avaliação histológica mostrou manutenção das lesões nos grupos isquêmicos.

Concluimos que o pré-condicionamento apresentou efeito protetor da respiração mitocondrial com leve distúrbio bioquímico e histológico de imediato e que há viabilidade de recuperações de lesões hepáticas por I/R em ratos Wistar tardiamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Nakazato PCG, Victorino JP, Fina CF, Mendes KDS, Gomes MCJ, Evora PRB, et al. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy. *Acta Cir Bras*. 2018; 33(8):723-35.
- 2- Freitas SH, Dória RG, Bueno RS, Rocha WB, Jair Filho RE, Moraes JR, et al. Evaluation of potential changes in liver and lung tissue of rats in an ischemia-reperfusion injury model (modified pringle maneuver). *PLoS One*. 2017;12(6):e0178665.
- 3- Gracia-Sancho J, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(4):345-62.
- 4- Van Riel WG, van Golen RF, Reiniers MJ, Heger M, van Gulik TM. How much ischemia can the liver tolerate during resection? *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016;5(1):58-71.
- 5- Ryu CH, Lee SK. Biliary strictures after liver transplantation. *Gut Liver*. 2011;5(2):133-42.
- 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- 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.

- 8- Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, Haagsma EB. Biliary complications after liver transplantation: a review. *Scand J Gastroenterol.* 2006;(243):89-101.
- 9- 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.
- 10-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.
- 11-Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection - the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;(26)180-87.
- 12-Jones RT, Toledo-Pereyra LH, Quesnelle KM. Selectins in liver ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2015;28(5):292-300.
- 13-Guan LY, Fu PY, Li PD, Li ZN, Liu HY, Xin MG, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg.* 2014;6(7):122-8.
- 14-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.
- 15-Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol.* 2013;19(11):1683-98.

- 16-Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg*. 2016;33:57-70.
- 17-Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg*. 1908;48(4):541-9.
- 18-Cannon JA. Brief report. *Transplant Bull*. 1956;3:7.
- 19-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.
- 20-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.
- 21-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.
- 22-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.
- 23-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.

- 24-Giovanardi RO, Giovanardi HJ, Bozetti M, Garcia R, Lima LP. Intermittent total pedicular clamping in hepatic resections in noncirrhotic patients. *Hepatogastroenterology*. 2002;49(45):764-9.
- 25-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.
- 26-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(6):1875-8.
- 27-Tártaro RR, Jorge GL, Leonardi MI, Escanhoela CAF, Leonardi LS, Boin IFSF. No protective function found in Wistar rats submitted to long ischemia time and reperfusion after intermittent clamping of the total hepatic pedicle. *Transplant Proc*. 2015 May;47(4):1038-41.
- 28-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.
- 29-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.
- 30-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.

- 31-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.
- 32-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.
- 33-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.
- 34-Nieuwenhuijs VB, Bruijn MT, Schiesser M, Morphett 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.
- 35-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.
- 36-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.
- 37-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.

- 38-Zhang J, Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994;263:687-9.
- 39-Striffler G, Tuboly E, Szél E, Kaszanyi E, Cao C, Kaszaki J, et al. Inhaled Methane Limits the Mitochondrial Electron Transport Chain Dysfunction during Experimental Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One*. 2016; Jan 7;11(1).
- 40-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. Feb;91(2):456-64.
- 41-Rudiger HA, Koo J, Kang KJ, Sindram D, Hans MR, Pierre AC. Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg.* 2002 Mar;235(3): 400-7.
- 42-Prieto I, Monsalve M. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning. *Redox Biol.* 2017 Aug;12:1020-25.
- 43-Reiniers MJ, van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver *Antioxid. Redox Signal*, 2014,21:1119-42.
- 44-Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J. Gastroenterol.* 2004,10:1934-8.
- 45-Chu MJ, Premkumar R, Hickey AJR, Jiang Y, Delahunt B, Phillips ARJ, et al. Steatotic livers are susceptible to normothermic ischemia-reperfusion injury from

- mitochondrial Complex-I dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2016 May 21; 22(19): 4673-84.
- 46-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.
- 47-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.
- 48-Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(7):718-24.
- 49-Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(1):G15-26.
- 50-Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*. 1997;61(6):647-53.
- 51-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.
- 52-Vesa A, Henri H, Fredrik Y, Johanna H, Tuomas A, Tatu J. Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials. *Scand Cardiovasc*. 2016 Set 20; 50(5-6):355-61.

- 53-Hand SC, Menze MA. Mitochondria in energy-limited states: mechanisms that blunt the signaling of cell death. *J Exp Biol.* 2008;211:1829–40.
- 54-Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, Zielinska M. Ischaemic preconditioning - Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv Med Sci.* 2017 May 13;62(2):307-16.
- 55-Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1966;41:445e502.
- 56-Rolo AP, Teodoro JS, Peralta C, Rosello-Catafau J, Palmeira CM. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATPsynthase and mitochondrial permeability transition. *Transpl. Int.* 2009; 22:1081-90.
- 57-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.
- 58-Elias D, Desruennes E, Lasser P. Prolonged intermittent clamping of the portal triad during hepatectomy. *Br J Surg.* 1991;78(1):42-4.
- 59-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.
- 60-Radojkovic M, Stojanovic M, Stanojevic G, Radojkovic D, Gligorijevic J, Ilic I, et al. Ischemic preconditioning vs adenosine vs prostaglandin E1 for protection against liver ischemia/reperfusion injury. *Braz J Med Biol Res.* 2017;Jul 20;50(8):e6185.

- 61-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.
- 62-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.
- 63-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.
- 64-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.
- 65-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.
- 66-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.
- 67-Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand*. 1986;548:9-37.
- 68-Mitnacht SJr, Faber JL. Reversal of ischemia mitochondrial dysfunction. *J. Biol Chem*. 1981;256(7):3199-206.

- 69-Vercesi AE. The role of Ca^{2+} in the process of mitochondrial damage associated with oxidative stress. *Química Nova*. 1993;16:381-4.
- 70-Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81(5):637-47.
- 71-Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology*. 1995;108(1):252-75.
- 72-Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology*. 1990;11(4):690-8.
- 73-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.
- 74-Woods HF, Krebs HA. Lactate production in the perfused rat liver. *Biochem J*. 1971;125(1):129-39.
- 75-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.
- 76-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.
- 77-Kamiiike 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.

- 78-Metzger J, Lauterburg BH. Postischemic ATP levels predict hepatic function 24 hours following ischemia in the rat. *Experientia*. 1988;44(5):455-7.
- 79-Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(2):335-44.
- 80-Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973;134(3):707-16.
- 81-Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 2008;321(5895):1493e5.
- 82-Liu SS. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Biosci Rep*. 1997;17(3):259-72.
- 83-Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med (Berl)*. 1999;77(8):577-92.
- 84-Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Jimenez-Castro M, Peralta C. Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl*. 2011;17(9):993-1004.
- 85-Pretto EA. Cardiac function after hepatic ischemia-anoxia and reperfusion injury: a new experimental model. *Crit Care Med*. 1991;19(9):1188-94.
- 86-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.

- 87-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.
- 88-Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):12-5.
- 89-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.
- 90-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.
- 91-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.
- 92-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.
- 93-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.

- 94-Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):63-7.
- 95-Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002;192(2):131-7.
- 96-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.
- 97-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.
- 98-Velho JA, Okanobo H, Degasperis GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, et al. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology.* 2006;219(1-3):124-32.
- 99-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.
- 100- 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
- 101- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191:144-8.

- 102- Schneeberger S, Kuznetsov AV, Seiler R, Renz O, Meusbürger 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.
- 103- 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.
- 104- 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.
- 105- 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.
- 106- 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.
- 107- 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.

- 108- Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 1992;307(1):108-12.
- 109- 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.
- 110- 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.
- 111- 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.
- 112- Jorge GL, Tartaro RR, Escanhoela CAF, Boin IFSF. Later evaluation of ischemia and reperfusion by the Pringle Maneuver in Wistar rats, demonstrating that hepatic lesions can be reversible. *Transplant Proc* 2017;49:898e901.
- 113- Quireze Jr C, Speranzini MB, Montero EFS, Juliano Y, Novo NF, Nigro AJT. Efeito da hipotermia hepática na isquemia e reperfusão em ratos. *Acta Cir. Bras.* 2000;15(1).
- 114- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 2000;87(11):972-83.
- 115- 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.

- 116- Santos JS, Zucoloto S, Castro e Silva Jr O, Salgado Jr W, Ceneviva R. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia: cirrose biliar secundaria. São Paulo: 1998;34:377-8.
- 117- Szabo 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;78:1051e63.
- 118- Wang Y, Shen J, Xiong X, Xu Y, Zhang H, Huang C, et al. Remote Ischemic Preconditioning Protects against Liver Ischemia-Reperfusion Injury via Heme Oxygenase-1-Induced Autophagy. *PLoS One*. 2014; 9(6): e98834.
- 119- Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997;226:704e13.

ANEXOS

ANEXO I - Aprovação do Comitê de Ética do Artigo 1



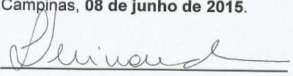
CERTIFICADO

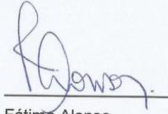
Certificamos que o projeto intitulado "Estudo metabólico e morfológico tardio do rato Wistar, após tempos variados de isquemia/reperfusão hepática, pela manobra de Pringle", protocolo nº 3905-1, sob a responsabilidade de Prof. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin / Rodolfo Dos Reis Tartaro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 08 de junho de 2015.

Vigência do projeto: 03/2016-03/2017
Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar
No. de animais: 35
Peso/Idade: 08 semanas / 300gr
Sexo: machos
Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 08 de junho de 2015.


Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II - Aprovação do Comitê de Ética do Artigo 2



CEUA/Unicamp

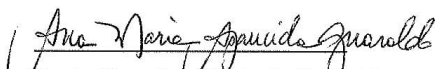
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

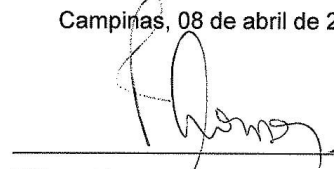
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "ESTUDO METABÓLICO E MORFOLÓGICO DO PÓS OPERATÓRIO DO RATO WISTAR APÓS ISQUEMIA/REPERFUSÃO HEPÁTICA, PELA MANOBRA DE PRINGLE" (protocolo nº 3042-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin / Gracinda De Lourdes Jorge, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **08 de abril de 2013**.

Campinas, 08 de abril de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO III – Direitos autorais

 ELSEVIER (<https://www.elsevier.com/>)

  (<https://checkout.elsevier.com/cart>) 

[Casa](#) (<https://www.elsevier.com/>) - [Sobre](#) (<https://www.elsevier.com/about>) - [Políticas](#) (<https://www.elsevier.com/policies>) - [direito autoral](#) (<https://www.elsevier.com/copyright>) - [Permissões](#) (<https://www.elsevier.com/permissions>)

Permissões

Como regra geral, deve ser solicitada permissão do detentor dos direitos para reproduzir qualquer parte substancial de uma obra protegida por direitos autorais. Isso inclui qualquer texto, ilustrações, gráficos, tabelas, fotografias ou outro material de fontes publicadas anteriormente. Obter permissão para reutilizar o conteúdo publicado pela Elsevier é simples. Siga o guia abaixo para obter um caminho rápido e fácil para obter permissão.

[Diretrizes de permissão](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#guidelines) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#guidelines>) [Conteúdo Científico](#)

Instruções de permissão

Para obter mais orientações sobre como obter permissão, consulte nossas Perguntas frequentes abaixo:

- [Quando a permissão é necessária?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Quando a permissão não é necessária?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [De quem eu preciso de permissão?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Como obtenho permissão para usar fotografias ou ilustrações?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Preciso obter permissão para usar o material publicado em um site?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Quais direitos a Elsevier exige ao solicitar permissão?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Como obtenho permissão de outro editor?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [O que é o Rightslink?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [O que devo fazer se não conseguir localizar o proprietário dos direitos autorais?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Posso obter permissão de uma Organização de Direitos de Reprodução \(RRO\)?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [A Elsevier é uma editora signatária do STM?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Preciso solicitar permissão para reutilizar o trabalho de outro editor do STM?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Preciso solicitar permissão para enviar texto para o conteúdo da Elsevier?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Posso incluir / usar meu artigo em minha tese / dissertação?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Sim. Os autores podem incluir seus artigos, no todo ou em parte, em uma tese ou dissertação para fins não comerciais.](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Quais usos de um trabalho Elsevier vê como uma forma de 'publicação prévia'?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)
- [Como obtenho permissão para usar o material do Elsevier Journal, como figuras, tabelas ou trechos de texto, se a solicitação estiver dentro das diretrizes de permissões do STM?](https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#) (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#top>)



Como obtenho permissão para usar o material do Elsevier Journal, como figuras, tabelas ou trechos de texto, se a quantidade de material que desejo usar não se enquadra nos limites livres estabelecidos nas diretrizes de permissões do STM? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como obtenho permissão para usar o material do Elsevier Book, como figuras, tabelas ou trechos de texto? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como obtenho permissão para usar material da Elsevier que NÃO esteja no ScienceDirect ou na Clinical Key? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Posso usar material do meu artigo da Elsevier na minha tese / dissertação? –

As an Elsevier journal author, you have the right to Include the article in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially) whether in full or in part, subject to proper acknowledgment; see the Copyright page (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright>) for more information. No written permission from Elsevier is necessary.

This right extends to the posting of your thesis to your university's repository provided that if you include the published journal article, it is embedded in your thesis and not separately downloadable.

Posso modificar uma figura depois de receber permissão para usá-la? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Posso modificar o material Lancet? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como obtenho cópias de um livro em um formato adequado para uma pessoa com deficiência? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Qual é a política do Instituto Nacional de Saúde (NIH) para depositar artigos no PubMed Central? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como devo reconhecer o material da Elsevier? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como faço para configurar uma conta Rightslink? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como autor de um livro da Elsevier, posso postar meu capítulo em um site? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como solicito permissão para usar imagens NETTER? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Posso postar meu artigo da Elsevier no meu Repositório Institucional? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Como posso compartilhar meu artigo da Elsevier (Compartilhamento acadêmico)? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Posso postar meu artigo no ArXiv? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Posso postar meu artigo no ResearchGate sem violar os direitos autorais? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Qual é a política da Elsevier sobre o uso de fotografias de pacientes? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

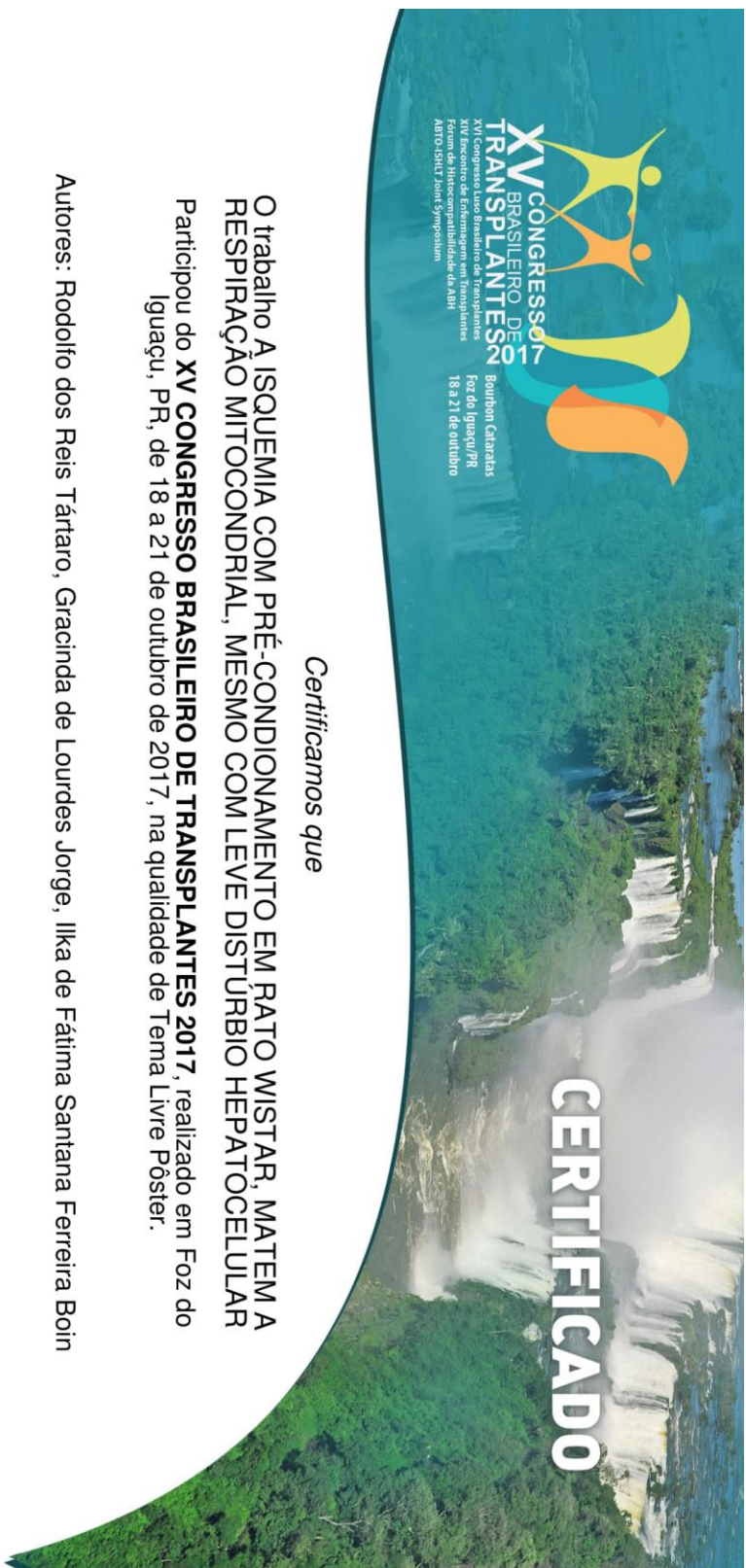
Onde posso encontrar o formulário de solicitação de permissão da Elsevier para solicitar a permissão de outro detentor de direitos autorais? (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#>)

Obtenção de permissão para usar o conteúdo no ScienceDirect

Se o conteúdo que você deseja reutilizar estiver no ScienceDirect, (<http://www.sciencedirect.com/>) você poderá solicitar permissão usando o serviço Rightslink® do Copyright Clearance Center. Basta seguir os passos abaixo:

- 1 Locate your desired content on ScienceDirect. Subscribers will be able to view all content and guest users can view open access content and abstracts for free simply by clicking on the article or chapter title. (<https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions#top>)

ANEXO IV - Certificados de Apresentação em Congressos Nacionais e Internacionais





4 A 7 DE OUTUBRO DE 2017

Sheraton Reserva do Pau - Hotel & Convention Center - Recife - Brasil
hepatol2017.com.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho
***A isquemia com pré-condicionamento em rato Wistar, mantém a
respiração mitocondrial, mesmo com leve distúrbio
hepatocelular***

dos autores **Rodolfo dos Reis Tartaro** Gracinda de Lourdes Jorge Ilka de
Fatima Santana Ferreira Boin
foi apresentado na forma de **Pôster**.
no **XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE HEPATOLOGIA**, realizado
no período de 04 a 07 de outubro de 2017, no Sheraton Reserva do Pauva
Hotel & Convention Center em Recife/PE

Eduardo Lopes

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes
Presidente da Sociedade Brasileira
de Hepatologia Gestão 2016/2017

Edna Straus

Edna Straus
Secretária Geral da Sociedade Brasileira
de Hepatologia Gestão 2016/2017

Andra Dória Batista

Andra Dória
Coordenadora da Comissão de Temas
Livres XXIV Congresso Brasileiro
De Hepatologia



Promoção e Realização

CERTIFICADO

Certificamos que **Rodolfo dos Reis Tártaro**, juntamente com os coautores **Rodolfo dos Reis Tártaro, Gracinda de Lourdes Jorge, Antonio Henrique Dianin, Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, Ilka de Fátima Santana Ferreira Boim**, apresentou o trabalho: **A isquemia com pré-condicionamento em rato Wistar, mantém a respiração mitocondrial, mesmo com leve distúrbio hepatocelular** no formato de pôster na 11ª Semana de Pesquisa, realizada de 17 a 19 de maio de 2018.

		
Prof. Dr. Roberto Teixeira Mendes Diretor Associado da FCM	Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Moretti Comissão de Pesquisa - FCM	Prof. Dr. Rogel Frigério Castilho Comissão de Pesquisa



Faculdade de
Ciências Médicas



UNICAMP

CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO

Certifica-se que o trabalho

RECUPERAÇÃO DO SISTEMA DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA, APÓS MANOBRA DE PRINGLE EM RATOS WISTAR
Graciinda de Lourdes Jorge , Rodolfo dos Reis Tártaro , Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, Ika de Fátima Santana Ferreira Boin

Foi apresentado sob a forma de COMUNICAÇÃO ORAL no **XV Congresso Luso Brasileiro de Transplantação**, que decorreu de 13 a 15 de outubro de 2016, no Porto Palácio Hotel – Porto – Portugal.

Porto, 15 de outubro de 2016



Susana Sampaio
Presidente do Congresso

