

**GIOLANA NUNES**

**A solução salina hipertônica a 7,5%, quando associada a hipotermia, pode trazer benefícios na redução de lesão secundária à isquemia/reperfusão hepática?**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Ciências em  
Gastroenterologia

Orientadora:  
Profa. Dra. Estela Regina Ramos  
Figueira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Giolana

A solução salina hipertônica a 7,5%, quando associada a hipotermia, pode trazer benefícios na redução de lesão secundária à isquemia/reperfusão hepática? / Giolana Nunes. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.  
Orientadora: Estela Regina Ramos Figueira.

Descritores: 1.Cirurgia 2.Hepatectomia  
3.Transplante de fígado 4.Transaminases 5.Anti-  
inflamatórios 6.Solução salina hipertônica

USP/FM/DBD-251/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico este trabalho a minha **mãe Maria Belmira Nunes** e aos **meus antepassados**, por aprender com eles a ter coragem para desbravar territórios nunca antes palmilhados, e fazer dos medos, da impotência e do desconhecimento, molas propulsoras, que impulsionam persistentemente, em busca de novas conquistas, não nos acomodando jamais ao conforto do já alcançado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dr. José Jukemura por abrir as portas da possibilidade de realizar este trabalho, apresentando-me ao LIM-37.

A Dra. Estela R. R. Figueira pelo acolhimento, ensino, orientação, rigor, disponibilidade, e crédito em tornar nosso trabalho uma realidade.

Ao prof. Dr. Emilio E. Abdo por ensinar e me inserir no modelo experimental de hipotermia regional em ratos, por ele desenvolvido.

A Nilza Molan e a Sandra Sampietre, pelo apoio na execução do experimento.

A Dra. Rosely A. Patzina pela análise histopatológica e disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho.

Ao professor Luiz A. Carneiro D'Albuquerque, pela credibilidade em nosso trabalho e empenho.

A amiga Sueli Dallari pelo carinho, incentivo, sugestões e correções.

A Marizilda Paulino pela escuta cuidadosa e diferenciada, profissionalismo idôneo, presença contínua e constante.

A Mérili de Oliveira dos Santos pelo amor, paciência, apoio, compartilhando esta jornada, tornando-a possível.

Aos meus familiares, pelo amor, torcida, incentivo, carinho e presença.

A todos que de forma ostensiva ou anônima me apoiaram na realização deste trabalho.

## NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO.....	15
3. MÉTODOS .....	16
3.1 Animais de experimentação.....	16
3.2 Desenho experimental .....	16
3.2.1 Anestesia, procedimentos cirúrgicos e cuidados pós-operatório ..	17
3.2.2 Indução da hipotermia do fígado .....	20
3.2.3 Período pós-reperfusão do fígado .....	22
3.3 Grupos de estudo .....	24
3.4 Parâmetros avaliados .....	25
3.4.1 Análise bioquímica.....	25
3.4.2 Análise histológica do fígado .....	26
3.4.3. Análise de citocinas .....	27
3.4.4 Peroxidação lipídica.....	28
3.4.5 Análise da atividade da mieloperoxidase pulmonar .....	28
3.4.6 Avaliação de parâmetro hemodinâmico .....	29
3.4.7 Análise estatística .....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1. Análise Bioquímica .....	31
4.1.1. Transaminase aspartato aminotransferase (AST) .....	31
4.1.2. Transaminase alanina aminotransferase (ALT) .....	32
4.2. Análise dos Mediadores Inflamatórios .....	34
4.2.1. Interleucina-6 (IL-6).....	34
4.2.2. Interleucina 10 (IL- 10).....	35
4.2.3. Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	36

4.3. Escore Histológico .....	37
4.3.1. Necrose .....	38
4.4. Atividade da Mieloperoxidase Pulmonar (MPO) .....	40
4.5. Estresse Oxidativo (MDA).....	41
4.6. Parâmetros Hemogasométricos .....	42
4.6.1. Bicarbonato (HCO <sub>3</sub> ) .....	42
4.6.2. Excesso de Bases (SBE).....	43
4.6.3. Sódio (Na <sup>+</sup> ).....	44
4.6.4. Potássio (K <sup>+</sup> ) .....	45
4.6.5. Cálcio iônico (iCa).....	46
4.6.6. Lactato (Lac).....	47
4.6.7. Glicose (Glu).....	48
4.7. Análise de parâmetro hemodinâmico.....	49
4.7.1. Pressão Arterial Média (PAM).....	49
5. DISCUSSÃO .....	50
6. CONCLUSÕES .....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
8. ANEXOS .....	66
ANEXO 1. Identificação dos ratos (R) por grupos: .....	76
ANEXO 2. Valores séricos de Aspartato Aminotransferase (AST). .....	76
ANEXO 3. Valores séricos de Alanina Aminotransferase (ALT) .....	77
ANEXO 4. Valores séricos da Interleucina6 (IL-6).....	77
ANEXO 5. Valores séricos da Interleucina 10 (IL-10).....	78
ANEXO 6. Valores séricos do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) 78	
ANEXO 7. Valores do Escore Histológico.....	79
ANEXO 8. Valores de Grau de Necrose .....	79
ANEXO 9. Valores da atividade da Mieloperoxidase(MPO) .....	80
ANEXO 10. Valores da atividade do Malonaldeído (MDA) .....	80
ANEXO 11. Valores séricos de Bicarbonato (HCO <sub>3</sub> ) .....	81
ANEXO 12. Valores séricos de Excesso de Bases (SBE) .....	81
ANEXO 13. Valores séricos de Sódio (Na).....	82
ANEXO 14. Valores séricos de Potássio(K) .....	82
ANEXO 15. Valores séricos de Cálcio iônico (iCa).....	83
ANEXO 16. Valores séricos de Lactato (Lac) .....	83
ANEXO 17. Valores séricos de Glicose (Glu).....	84
ANEXO 18. Valores de Pressão Arterial Média (PAM).....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

<b>A</b>	ampère
<b>ANOVA</b>	análise de Variância
<b>ALT</b>	alanina aminotransferase
<b>AST</b>	aspartato aminotransferase
<b>BR</b>	Brasil
<b>°C</b>	grau centigrado
<b>Cai</b>	cálcio iônico
<b>CD11b</b>	receptor de superfície de leucócitos
<b>CD18</b>	receptor de superfície de leucócitos
<b>CINC-1</b>	citocina indutora de quimioatração neutrofílica
<b>cm</b>	centímetro
<b>CXC</b>	quimiocinas
<b>DC</b>	débito cardíaco
<b>DO</b>	densidade óptica
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>eNOS</b>	enzima óxido nítrico sintetase endotelial
<b>ERO</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>g/ dl</b>	grama por decilitro
<b>Gluc</b>	glicose
<b>g/min</b>	grama por minuto
<b>HCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato
<b>HE</b>	hematoxilina-eosina
<b>HMGB1</b>	grupo de alta mobilidade um (high mobility group Box1)
<b>[H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>]</b>	peróxido de hidrogênio
<b>[HO<sup>2</sup>]</b>	radical hidroxiperoxil
<b>HO-1</b>	heme oxigenase endógena
<b>Hz</b>	hertz
<b>ICAM-1</b>	molécula de adesão intercelular 1
<b>IF</b>	isquemia fria



**IFHI** grupo isquemia fria tratado com solução salina hipertônica antes da isquemia

**IFHR** grupo isquemia fria tratado com solução salina hipertônica antes da reperfusão

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	interleucina um alfa
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina um beta
<b>IL-6</b>	interleucina seis
<b>IL-8</b>	interleucina oito
<b>IL-10</b>	interleucina dez
<b>IQ</b>	isquemia quente
<b>IR</b>	isquemia/reperfusão
<b>Lac</b>	lactato
<b>LIM 37</b>	laboratório de investigação médica trinta e sete
<b>LTDA</b>	limitada
<b>MDA</b>	malonaldeído
<b>mEq/L</b>	miliequivalente por litro
<b>mg</b>	miligrama
<b>mg/dL</b>	miligrama por decilitro
<b>mg/Kg</b>	miligrama por kilo de peso
<b>min.</b>	minuto
<b>MIP-2</b>	proteína dois inflamatória macrofágica
<b>ml</b>	mililitro
<b>ml/g</b>	mililitro por grama de peso
<b>mm</b>	milimetro
<b>mmHg</b>	milimetro de mercúrio
<b>mmol/L</b>	milimol por litro
<b>MPO</b>	mieloperoxidase
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>nm</b>	nanômetro
<b>nmol</b>	nanomol
<b>NS</b>	não significante
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>[OH]</b>	radical hidroxila

<b>[O<sup>2-</sup>]</b>	radical superóxido
<b>PAF</b>	fator ativador de plaquetas
<b>pg/ml</b>	picograma por mililitro
<b>PMN</b>	polimorfonucleares
<b>PAM</b>	pressão arterial média
<b>pO<sub>2</sub></b>	pressão parcial de oxigênio
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>S</b>	sham
<b>SO<sub>2</sub></b>	saturação de oxigênio
<b>SSH</b>	solução salina hipertônica
<b>STAT3</b>	sinal de transdução e ativação de transcrição
<b>TBARS</b>	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>U/L</b>	unidade por litro
<b>V</b>	volts
<b>W</b>	watts
<b>%</b>	porcentagem

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Graduação histológica de lesão de isquemia/reperfusão hepática segundo Quireze et al(70).....	27
--	----

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Desenho do hepatócito com membrana celular dupla e canais de troca iônica, dependentes de energia. Demonstração esquemática da produção de ERO no meio intracelular e mitocondrial, secundário a hipoxemia, gerando estresse oxidativo.....4

**Figura 2.** Esquema explicativo dos efeitos da isquemia e reperfusão, desencadeando processos bioquímicos, resultando na produção de radicais livres de oxigênio, os quais causam lesão de aminoácidos, proteínas e membranas celulares, ácidos nucleicos e enzimas, levando por fim, à morte celular .....5

**Figura 3.** Modelo dos processos desencadeados pela IR a nível sinusoidal, por ativação de moléculas, cél. inflamatórias e agentes quimiotáticos, produção de ERO e liberação de proteases; edema endotelial e vasoconstrição, estagnação dos leucócitos e agregação plaquetária aos sinusóides, alterações da microcirculação e exacerbação da inflamação; desequilíbrio entre a produção de óxido nítrico e endotelinas, lesões do endotélio sinusoidal e adesão de plaquetas, piora do fluxo sanguíneo, maior atração e infiltração de leucócitos. ....9

**Figura 4.** Procedimento cirurgico com animais sob anestesia geral, entubados, conectados a ventilação mecânica, sobre leito aquecido com temperatura controlada sob monitorização corporal via retal. Animal à esquerda da imagem, submetido a hipotermia do fígado com coxins de gelo moído sobre placa de poliestireno, com monitor local de temperatura (6,7°C)..... 18

**Figura 5.** Descrição anatômica dos lobos hepáticos do fígado de ratos Wistar ..... 19

**Figura 6.** Lobos hepáticos luxados pra cima, isolamento do pedículo hepático (fio algodão azul 3-0) comum dos lobos medianos e lateral esquerdo e oclusão com clampe vascular ..... 19

**Figura 7.** Animal anestesiado, entubado, fixado sobre cama térmica, submetido a isquemia sob hipotermia dos lobos mediano e anterolateral esquerdo do fígado, com gelo tópico em dedos de luva, isolados do corpo por placa de poliestireno branca, controle da temperatura local (termômetro digital de superfície - fio amarelo) e da corporal (termômetro retal - fio preto). .....21

**Figura 8.** Experimento no LIM-37 com animal anestesiado, entubado, conectado ao respirador, fixado sobre cama aquecida à 37°C, laparotomizado, submetido a isquemia sob hipotermia (coxins de gelo em dedos de luva) dos lobos mediano e anterolateral esquerdo do fígado, isolados do corpo com placa de poliestireno, monitorização da temperatura regional hepática (monitor azul) e corporal (monitor branco), materiais cirúrgicos, seringas para injeção de SSH endovenosa e de SF 0,9% subcutânea .....22

**Figura 9.** Animal sob anestesia, entubado, cânula orotraqueal e extensor fixados ao leito, cateter vascular inserido em arterial carótida direita após dissecação, para medidas hemodinâmicas invasivas e coleta de sangue arterial para análises .....23

**Figura 10.** Delineamento do experimento: grupos de animais do estudo submetidos a 40 min. de isquemia quente (IQ) ou fria (IF, IFHI e IFHR) e 4h de reperfusão. Grupos IFHI e IFHR receberam SSH a 7,5%, 10 min. antes da isquemia e da reperfusão, respectivamente.....25

**Figura 11.** Monitor Hemodinâmico observando-se no centro da tela, curva da PAM.....30

**Figura 12.** Fotos de microscopia óptica, aumento de 40x, coloração HE, demonstrando os seguintes achados histopatológicos secundários ao processo de I/R hepática, dos grupos IQ: infiltrado mononuclear leve, esteatose microgoticular (seta cinza) e necrose de células isoladas (seta preta); grupo IF: esteatose leve e focal (seta cinza), múltiplos focos de necrose (seta preta); grupo IFHI: arquitetura preservada, esteatose leve e focal (seta preta), necrose focal; IFHR: arquitetura preservada, esteatose leve e focal (seta cinza).....59

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Níveis séricos de AST 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo sham; #p<0,05 comparado ao grupo IQ..... 32

**Gráfico 2.** Níveis séricos de ALT 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo sham; #p<0,05 comparado ao grupo IQ..... 33

**Gráfico 3.** Níveis séricos de IL-6 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo sham; #p<0,05 comparado ao grupo IQ..... 34

**Gráfico 4.** Níveis séricos de IL-10 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo sham; #p<0,05 comparado ao grupo IQ..... 35

**Gráfico 5.** Níveis séricos de TNF- $\alpha$  4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo sham, #p<0,05 comparado ao grupo IQ, %p<0,05 comparado ao grupo IFHR..... 36

**Gráfico 6.** Escore histológico da lesão de reperfusão hepática avaliado 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo sham, #p<0,05 comparado ao grupo IQ ..... 37

**Gráfico 7.** Grau de necrose hepática avaliado 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão... 38

**Gráfico 8.** Atividade da MPO avaliada 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% aantes da Reperfusão. N =10 por grupo. <sup>§</sup>p<0,05 comparado ao grupo IF..... 40

**Gráfico 9.** Estresse oxidativo avaliado no tecido hepático 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da reperfusão. N =10 por grupo. <sup>#</sup>p<0,05 comparado ao grupo IQ, <sup>§</sup>p<0,05 comparado ao grupo IF ..... 41

**Gráfico 10.** Níveis séricos de bicarbonato 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. <sup>#</sup>p<0,05 comparado ao grupo IQ. .... 42

**Gráfico 11.** Níveis séricos de excesso de base 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. <sup>#</sup>p<0,05 comparado ao grupo IQ. .... 43

**Gráfico 12.** Níveis séricos de sódio 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. <sup>#</sup>p<0,05 comparado ao grupo IQ, <sup>§</sup>p<0,05 comparado ao grupo IF. .... 44

**Gráfico 13.** Níveis séricos de potássio 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes Reperfusão. N =10 por grupo. .... 45

**Gráfico 14.** Níveis séricos de cálcio iônico 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5%

antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N=10 por grupo. \*p<0,005 comparado ao grupo sham. #p<0,05 comparado ao grupo IQ..... 46

**Gráfico 15.** Níveis de lactato arterial 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N =10 por grupo. \*p<0,005 comparado ao grupo sham, #p<0,05 comparado ao grupo IQ..... 47

**Gráfico 16.** Níveis séricos de glicose 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão N =10 por grupo. \*p<0,005 comparado ao grupo sham. .... 48

**Gráfico 17.** Pressão arterial média 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N =10 por grupo. \*p<0,005 comparado ao grupo sham. .... 49



## RESUMO

Nunes G. *A solução salina hipertônica a 7,5% quando associada a hipotermia, pode trazer benefícios na redução de lesão secundária à isquemia-reperfusão hepática?* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A lesão hepática secundária a isquemia/reperfusão (IR), inerente a cirurgia do transplante de fígado e as ressecções hepáticas, desencadeia reações inflamatórias de intensidade variável com impacto direto na sobrevida do paciente. A hipotermia do órgão reduz as lesões secundárias à IR sendo um dos pilares para a preservação dos enxertos para transplante. O objeto do estudo foi avaliar se a administração da solução salina hipertônica (SSH) a 7,5%, associada a hipotermia regional do fígado em ratos, seria capaz de reduzir a lesão secundária à IR hepática. Cinquenta ratos machos Wistar foram divididos em 5 grupos: grupo sham; grupo IQ, animais submetidos a 40min de isquemia quente dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado, seguido de reperfusão e ressecção dos lobos não isquemiados; grupo IF, animais submetidos a IR hepática com hipotermia hepática regional; grupo IFHI, animais submetidos a isquemia fria tratados com NaCl 7,5% pré-isquemia, 4mL/Kg; grupo IFHR, animais submetidos a isquemia fria, tratados com NaCl 7,5% pré-reperfusão. Após 4h de reperfusão foram coletadas amostras de sangue e tecidos para análise. Os principais achados deste estudo evidenciaram diminuição significativa dos níveis de AST e ALT nos animais submetidos a isquemia fria do grupo IF ( $2360 \pm 990$  UI/L e  $1409 \pm 768$  UI/L, respectivamente), IFHI ( $2182 \pm 728$  UI/L e  $1205 \pm 435$  UI/L) e IFHR ( $2387 \pm 1046$  UI/L e  $1373 \pm 717$  UI/L) em comparação ao grupo IQ ( $9935 \pm 3764$  UI/L e  $6871 \pm 3079$  UI/L); diminuição do grau histológico da lesão de IR e do grau de necrose hepatocelular dos animais dos grupos IF (3,5: 0–8 e 0,5: 0–2, respectivamente), IFHI (0; 0–5 e 0: 0–1) e IFHR (2,5; 0–10 e 0,5: 0–2) em comparação ao grupo IQ (8,5; 6–13 e 2; 1–3). Os animais submetidos a IF e IFHR apresentaram níveis diminuídos de IL-6 ( $923 \pm 618$  pg/mL e  $1139 \pm 401$  pg/mL, respectivamente) e IL-10 ( $203 \pm 146$  pg/mL e  $241 \pm 121$  pg/mL) respectivamente, comparáveis ao grupo IQ ( $2405 \pm 1618$  pg/mL e  $545 \pm 327$  pg/mL). Todos os animais submetidos a isquemia fria apresentaram níveis significativamente menores de TNF- $\alpha$  em comparação aos animais do grupo IQ ( $83,80 \pm 37,80$  pg/mL) e, os grupos IF ( $24,30 \pm 13,52$  pg/mL) e IFHI ( $26,20 \pm 21,38$  pg/mL) apresentaram níveis ainda menores que o grupo IFHR ( $53,40 \pm 18,25$  pg/mL). Os animais dos grupos IF ( $2,17 \pm 0,74$  nmol), IFHI ( $1,47 \pm 0,48$  nmol) e IFHR ( $2,10 \pm 1,10$  nmol) apresentaram níveis de MDA significativamente menores que os do grupo IQ ( $3,18 \pm 1,06$  nmol), sendo que o grupo IFHI apresentou níveis de MDA ainda menores que o grupo IF. O bicarbonato foi significativamente maior no grupo IFHI ( $20,84 \pm 1,76$  nmol/L) em comparação ao grupo IQ ( $15,9 \pm 5,26$  nmol/L). O grupo IQ ( $36,0 \pm 25,0$  mg/dL) apresentou níveis de lactato significativamente maiores que os grupos IF ( $16,3 \pm 8,64$  mg/dL), IFHI ( $15,5 \pm 4,09$  mg/dL) e IFHR ( $16,0 \pm 7,15$  mg/dL), sem diferença em relação ao grupo sham. Quanto a glicose, os animais submetidos a IF ( $230 \pm 34$  mg/dL), IFHI ( $199 \pm 47$  mg/dL) e IFHR ( $202 \pm 62$  mg/dL) apresentaram níveis significativamente maiores que os do grupo IQ ( $126 \pm 69$  mg/dL). Em relação a hemodinâmica, foi evidenciado que a PAM do grupo de animais submetido a IQ, foi significativamente menor que o sham, sem diferenças entre os demais grupos estudados. Conclui-se que a associação da SSH 7,5% à hipotermia regional do fígado em ratos reduz a lesão hepatocelular, o estresse oxidativo e os distúrbios iônicos secundários à IR, em especial quando utilizada no período pré-isquemia.

**Descritores:** Cirurgia; Hepatectomia; Transplante de fígado; Transaminases; Anti-inflamatórios; Solução salina hipertônica.

## ABSTRACT

Nunes G. *The hypertonic saline solution at 7,5% when associated with hypothermia, can benefit the reduction of the secondary damage to hepatic ischemia reperfusion?*[thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

The hepatic ischemia-reperfusion injury inherent to liver transplantation and hepatic resection surgery triggers inflammatory reactions of varying intensity with direct impact on patient survival. Hypothermia of the organ reduces secondary lesions of IR, being one of the pillars for the preservation of grafts for transplantation. The aim of the study was to evaluate the effects administration of HSS 7,5% associated with regional hypothermia of the liver, would be able to reduce the secondary damage to hepatic IR. Fifty male Wistar rats were divided into five groups: sham group; WI group: animals submitted to 40 minutes of warm ischemia of the middle and left lateral lobes, followed by reperfusion and resection of the non-ischemic lobes; CI group: animals submitted to regional cold ischemia; CIHI group; animals submitted to cold ischemia treated with HSS 7,5%, before ischemia, 4ml/kg; CIHR group, animals submitted to cold ischemia, treated with HSS 7,5%, before reperfusion, 4ml/kg. Four hours after reperfusion, blood and tissue samples were collected for analysis. The main findings of this study showed a significant decrease in the levels of AST and ALT in animals submitted to hypothermia of the CI ( $2360 \pm 990$  UI/L e  $1409 \pm 768$  UI/L, respectively), CIHI ( $2182 \pm 728$  UI/L e  $1205 \pm 435$  UI/L) and CIHR ( $2387 \pm 1046$  UI/L e  $1373 \pm 717$  UI/L) group, compared to the WI group ( $9935 \pm 3764$  UI/L e  $6871 \pm 3079$  UI/L); decrease in histological grade of lesion IR and degree of hepatocellular necrosis of the animals of the CI (3,5: 0–8 e 0,5: 0–2, respectively), CIHI (0; 0–5 e 0: 0–1) and CIHR (2,5; 0–10 e 0,5: 0–2) group, compared to the WI group (8,5; 6–13 e 2; 1–3). The animals of the CI and CIHR groups presented decreased levels of IL-6 ( $923 \pm 618$  pg/mL e  $1139 \pm 401$  pg/mL, respectively) and IL-10 ( $203 \pm 146$  pg/mL e  $241 \pm 121$ pg/mL), , comparable to group WI ( $2405 \pm 1618$ pg/mL e  $545 \pm 327$ pg/mL). All animals submitted to cold ischemia presented significantly lower levels of TNF- $\alpha$  compared to animals submitted to WI ( $83,80 \pm 37,80$  pg/mL) and the CI ( $24,30 \pm 13,52$  pg/mL ) and CIHI ( $26,20 \pm 21,38$  pg/mL) groups, presented even lower levels than the CIHR group ( $53,40 \pm 18,25$  pg/mL). The animals of the CI ( $2,17 \pm 0,74$  nmol), CIHI ( $1,47 \pm 0,48$  nmol) and CIHR ( $2,10 \pm 1,10$  nmol) groups presented level of the MDA significantly lower than those of the WI group ( $3,18 \pm 1,06$  nmol), being that the CIHI group presented even lower levels of the MDA than the CI group. The bicarbonate was significantly higher in the CIHI ( $20,8 \pm 1,76$  nmol/L) group compared to the WI group ( $15,9 \pm 5,26$  nmol/L). The WI group ( $36,0 \pm 25,0$  mg/dL) showed significantly higher levels of lactate than CI ( $16,3 \pm 8,64$  mg/dL), CIHI ( $15,5 \pm 4,09$  mg/dL) and CIHR ( $16,0 \pm 7,15$  mg/dL) groups. Regarding to glucose, the animals submitted to CI ( $230 \pm 34$  mg/dL), CIHI ( $199 \pm 47$  mg/dL) and CIHR ( $202 \pm 62$  mg/dL) presented levels significantly higher than the WI group ( $126 \pm 69$  mg/dL). In relation to hemodynamics, it was evidenced that the mean arterial pressure of the group of animals submitted to WI, was significantly lower than the sham group, without differences between the groups studied. It was concluded that the association of HSS 7,5% with regional hypothermia of the liver in rats, reduces hepatocellular damage, the oxidative stress and the ionic disturbances secondary to IR.

**Descriptors:** Surgery; Hepatectomy; Liver transplantation; Transaminases; Anti-inflammatory agents; Saline solution, hypertonic.

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão hepatocelular secundária ao processo de isquemia e reperfusão (IR) hepática(1), permanece sendo uma das principais causas de morbimortalidade, que afetam resultados de tratamentos, como o transplante de fígado e as cirurgias de ressecção hepática, particularmente quando utilizada a manobra de Pringle(2-5), a ressuscitação do trauma e do choque hipovolêmico(6, 7).

O mau funcionamento hepático inicial do órgão transplantado ocorre num percentual variável entre 5,2% a 36,3% dos casos, com diferentes graus de severidade, caracterizando-se por elevação sérica crescente das transaminases e bilirrubinas e coagulopatia(8). Entretanto, o restabelecimento completo da função hepática pode ocorrer em até duas semanas após o transplante. Nos casos de não funcionamento primário do enxerto, que representam 0,9% a 7,2% de perda dos mesmos, além das alterações descritas acima, o paciente desenvolve encefalopatia, hipoglicemia, coagulopatia grave e insuficiência renal aguda com acidose metabólica incorrigível, exigindo retransplante imediato pelo alto risco de óbito(8-10).

A lesão hepática inicial relaciona-se mais diretamente com o período de isquemia e, posteriormente, desenvolvem-se as lesões secundárias à reperfusão do órgão ou tecidos. Embora, esses processos estejam intimamente intrincados, algumas particularidades distinguem esses períodos que resultam em uma resposta inflamatória local, que evolui para uma resposta sistêmica

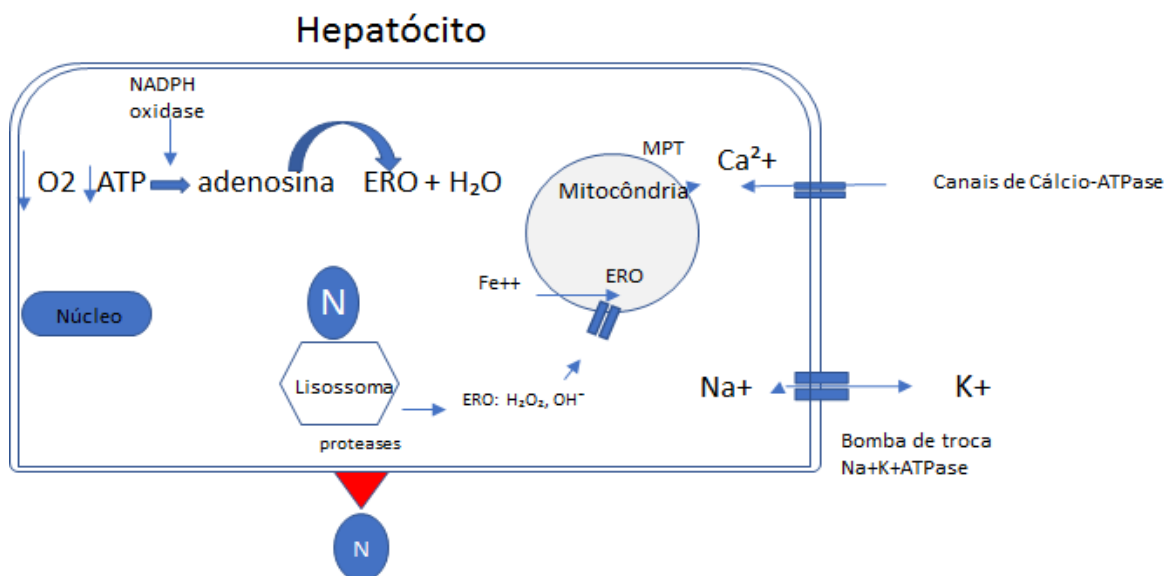
mais ou menos grave, dependendo do tempo e da intensidade do insulto inicial(1).

A reação inflamatória no próprio órgão ou em órgãos alvo (coração, pulmões, rins, intestino), produz o desencadeamento de vários processos bioquímicos e moleculares(11), que, caso não seja factível um controle em tempo hábil, levarão a um desfecho desfavorável com reflexo direto na morbidade e mortalidade dos pacientes. Os mecanismos que induzem a lesão gerada pelo processo de IR são multifatoriais e as alterações decorrentes são observadas a nível celular, produzindo alterações microvasculares(12) e histopatológicas(13). Elas consistem em complexas interações de vários fatores inflamatórios, anti-inflamatórios e bioquímicos, permitindo que ações externas interfiram nos diferentes processos, de forma a reduzir as lesões secundárias a IR hepática(14-18). Deste modo, justifica-se o grande interesse no desenvolvimento de estratégias que busquem agregar algo que possibilite intervir positivamente no processo, reduzindo as lesões secundárias à isquemia e reperfusão do fígado e, finalmente modificando o prognóstico desses pacientes.

A isquemia decorrente da interrupção ou do baixo fluxo sanguíneo(19) gera privação do aporte de oxigênio aos tecidos. O metabolismo celular privado de oxigênio (O<sub>2</sub>) – vital para a produção de energia a partir da glicose a nível mitocondrial, através da fosforilação do ADP em ATP e, necessário para manter a estabilidade do potencial de membrana mitocondrial – sofre grave redução dos elementos da cadeia respiratória. Inicia-se, desse modo, a anaerobiose, resultando na produção de íons hidrogênio, denominados espécies reativas de oxigênio (ERO)(20) e, no acúmulo de ácido

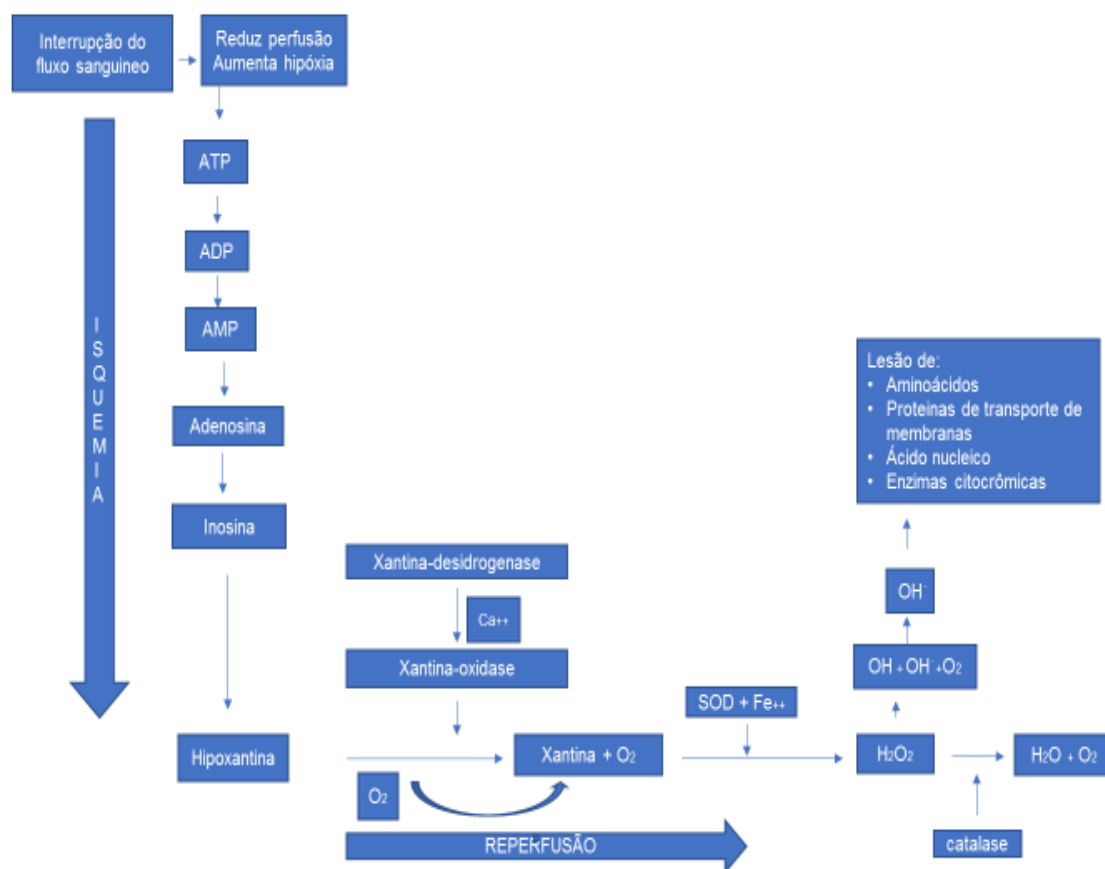
lático. Gera-se, assim, acidose tecidual e a cinética enzimática e a homeostase celular é alterada. (21, 22). A anóxia provoca queda dos níveis de ATP intracelular, com conseqüente redução da atividade da bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{ase}}$ , resultando em aumento da saída de potássio e entrada de sódio na célula. Ao mesmo tempo, ocorre diminuição da atividade da bomba de transporte de cálcio dependente de ATP ( $\text{Ca}^{2+}$   $\text{ATP}_{\text{ase}}$ ), abertura dos canais de cálcio voltagem dependentes, influxo e aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular(23-25). A hipóxia inicial a nível celular gera uma cascata de eventos bioquímicos que, em última instância, resulta em edema, disfunção e até necrose da célula, dependendo do tempo de isquemia decorrido(14, 15, 26).

Associado a alteração da homeostase e da permeabilidade celular, devido à disfunção das bombas de trocas iônicas e aos mecanismos reguladores celulares dependentes de energia (ATP), ocorre alteração osmótica do meio intracelular por acúmulo de cálcio, modificação da permeabilidade da membrana interna e do equilíbrio quimiosmótico mitocondrial, através de mecanismos dependentes de cálcio(27). Este processo é conhecido como alteração transitória da permeabilidade mitocondrial, que associado ao edema, disfunção e estresse oxidativo mitocondrial, pode ainda ser agravado pelo influxo de íons ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ), que é catalisador das reações químicas que produzem as ERO a partir da ruptura dos lisossomas (verdadeiros estoques de ERO intracelular). Há produção de grande toxicidade celular, resultando em grave alteração do citoesqueleto, desencadeando um processo letal com morte dos hepatócitos(7, 28), conforme ilustrado na figura abaixo.



**Figura 1.** Desenho do hepatócito com membrana celular dupla e canais de troca iônica, dependentes de energia. Demonstração esquemática da produção de ERO no meio intracelular e mitocondrial, secundário a hipoxemia, gerando estresse oxidativo.

No período de isquemia ocorre glicólise anaeróbica e hidrólise de ATP para produção de energia. A produção de ERO ocorre por aumento da atividade das enzimas NADPH oxidases, que são proteínas com função de transferência de elétrons através das membranas celulares, gerando adenosina a partir da conversão de ATP em ADP e AMP, resultando em grande acúmulo da mesma. Por sua vez, a adenosina produzida no meio intracelular é convertida a inosina e de hipoxantina a xantina, por ação da enzima xantina-oxidase(29, 30), resultando na produção de radicais livres derivados do oxigênio (radical hidroxila, radical hidroxiperoxil, peróxido de hidrogênio, radical superóxido) e água(16), como pode ser visto na figura 2.



**Figura 2.** Esquema explicativo dos efeitos da isquemia e reperfusão, desencadeando processos bioquímicos, resultando na produção de radicais livres de oxigênio, os quais causam lesão de aminoácidos, proteínas e membranas celulares, ácidos nucleicos e enzimas, levando por fim, à morte celular.

Os radicais livres reagem com as membranas celulares e outros compostos ou como receptores de elétrons das moléculas que oxidam, produzindo alterações celulares elétricas e bioquímicas, peroxidação lipídica e alteração da permeabilidade celular de hepatócitos, células de Küpffer e neutrófilos, conseqüentemente, produzindo edema, desestruturação do citoesqueleto e morte celular(16, 17, 20, 31). O papel das ERO e sua principal fonte, sede neutrófilos ou de células de Küpffer, e também a capacidade de promover estresse oxidativo, permanece controverso, sendo motivo de

diversas pesquisas que buscam determinar sua real contribuição na patogênese das lesões secundárias à IR hepática(7, 18, 22).

A reperfusão do órgão com o restabelecimento do fluxo sanguíneo e re-oxigenação dos tecidos, paradoxalmente, agrava a lesão hepatocelular, uma vez que inicia uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares, que além dos efeitos locais no órgão transplantado, podem produzir lesão de órgãos à distância, como pulmões, rins, cérebro, coração e intestinos(7, 17). As ERO, que são ácidos potentes, produzem uma queda do pH intracelular, o que parece ser benéfico e evitar necrose e morte celular. Isso tem sido denominado por vários autores de “paradoxo do pH”, visto haver sido observado durante a reperfusão, que o restabelecimento do fluxo sanguíneo, do aporte de O<sub>2</sub> e elevação do pH, produz piora do grau de lesão celular. O que sugere que certo grau de acidose é benéfico no período de reperfusão e que o pronto ajuste do pH promove danos celulares ainda maior(32).

Durante a fase de reperfusão, as lesões que se iniciaram na fase isquêmica são agravadas e podem ser descritas em dois períodos distintos: o precoce ou inicial, que tem início cerca de 20 a 30 minutos após a reperfusão, estendendo-se por até 2 a 4 horas; e a fase tardia, que se estende de 6 a 48 horas pós reperfusão(23, 32, 33). Na fase inicial da reperfusão, o restabelecimento do pH, com normalização da acidose tecidual, leva à deterioração da função mitocondrial, com liberação de citocromo C e outras proteínas pró-apoptóticas, assim como à produção de ERO mitocondrial e à sua liberação dos estoques celulares. A nível micro circulatório, ocorrem distúrbios secundários ao desequilíbrio entre a produção de óxido nítrico (NO), que é vasodilatador, e endotelinas (ET), que são vasoconstritoras. A lesão do

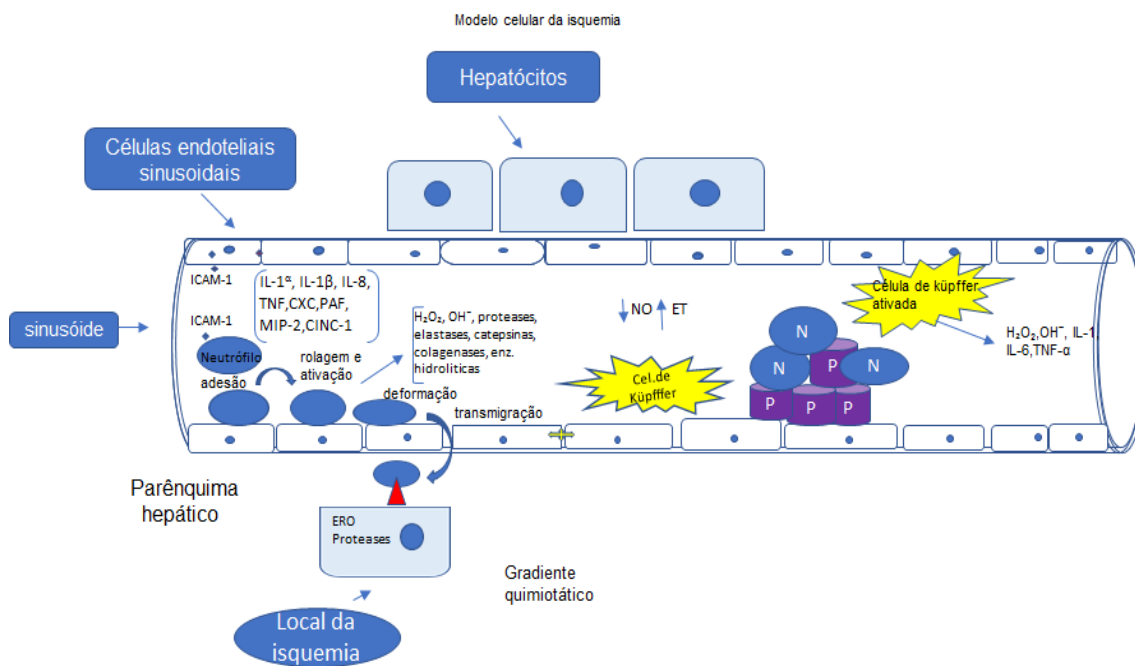


endotélio sinusoidal e a adesão de plaquetas ao mesmo se intensificam, reduzindo o fluxo sanguíneo. Ocorre maior ativação das células de Küpffer (macrófagos hepáticos) causando liberação de enzimas hidrolíticas, de ERO e quimiocinas, que produzem atração e grande infiltração de leucócitos. Todos estes eventos, ocorrendo associados e simultaneamente, geram agravo da lesão do enxerto e promovem reação inflamatória que pode culminar em morte celular(8, 23, 34).

Os polimorfonucleares (PMN) são parte da resposta imune inata ao trauma tecidual e infecção; participam na produção da lesão secundária à IR; entram em contato direto e aderem ao endotélio; apresentam alta mobilidade e migração transendotelial e subseqüentemente ligam-se à receptores glicoproteicos específicos na membrana das células parenquimais hepáticas; induzem à degranulação dos lisossomas com liberação de enzimas tóxicas, como metaloproteinases, elastases e proteases e à formação de ERO, como o peróxido de hidrogênio e o ácido hipoclorídrico, que se difundem dentro dos hepatócitos e geram estresse oxidativo intracelular, disfunção mitocondrial e abertura dos poros mitocondriais, o que conduz para a queda do potencial de membrana e morte celular por necrose(17, 21). Os PMN causam ainda, obstrução da microvasculatura através de sua ação mecânica, liberam mediadores tóxicos e recrutam outros mediadores celulares de lesão(15, 18, 35, 36).

Jaeschke H.et al(15), em estudo sobre os mecanismos de lesão hepática durante a IR, através da indução de neutrófilos e condições inflamatórias, observou que deflagrada a situação de estresse após a IR hepática, moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) são ativadas na superfície

de células sinusoidais endoteliais e de neutrófilos – mediante a presença de potentes agentes quimiotáticos e mediadores inflamatórios (interleucina-1 $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$ , interleucina-8, fator de necrose tumoral  $\alpha$ , CXC quimiocinas, fator ativador de plaquetas, keratinócitos, proteína-2 inflamatória macrofágica e a citocina indutora de quimioatração neutrofílica) – dando prosseguimento à chamada cascata de adesão, visto que essas glicoproteínas de superfície celular promovem adesões intercelulares e entre células e matrizes celulares. As moléculas de adesão constituem uma superfamília de glicoproteínas e são divididas em três grupos: selectinas, integrinas e imunoglobulinas, com diferentes características. As selectinas (E-selectinas, P-selectinas, L-selectinas) somente em condições de estresse são expressadas em células endoteliais, plaquetas e leucócitos respectivamente; são responsáveis por atrair, capturar e fazer a rolagem dos neutrófilos sobre o endotélio sinusoidal, e produzem sua firme adesão. Estes agentes inflamatórios promovem a fusão de vesículas secretoras com a membrana celular das paredes venosas (endotélio), devido estimularem a expressão de moléculas de adesão (CD11b/CD18: membro da família B2-integrina), bem como de outros receptores de superfície dos neutrófilos(15). O fator de necrose tumoral alfa(TNF- $\alpha$ ), por sua vez, considerada a mais importante molécula inflamatória, regula a produção e liberação de quimiocinas, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que pode ser elemento chave na lesão secundária da IR hepática(15, 33, 36), o que pode ser observado na ilustração abaixo.



**Figura 3.** Modelo dos processos desencadeados pela IR a nível sinusoidal, por ativação de moléculas, células inflamatórias e agentes quimiotáticos, produção de ERO e liberação de proteases; edema endotelial e vasoconstricção, estagnação dos leucócitos e agregação plaquetária aos sinusóides, alterações da microcirculação e exacerbação da inflamação; desequilíbrio entre a produção de óxido nítrico e endotelinas, lesões do endotélio sinusoidal e adesão de plaquetas, piora do fluxo sanguíneo, geram maior atração e infiltração de leucócitos.

Em outros estudos, Jaeschke H. et al (15, 23, 24) identificaram, que elementos protetores também são ativados, incluindo a heme oxigenase endógena (HO-1) (24) e a interleucina-10 (IL-10) (1, 37), que têm importância na reversibilidade do processo de lesão secundária à IR hepática. A interleucina-10 (IL-10) é uma molécula com potente ação anti-inflamatória, considerada até o momento como o mais importante fator anti-inflamatório dentro do processo que envolve a lesão de IR hepática.

Várias estratégias têm sido desenvolvidas na tentativa de achar meios que possam reduzir os danos celulares hepáticos secundários à IR. Dentre eles

está bem estabelecida a importância da redução do tempo de isquemia(21, 38), o uso da hipotermia sistêmica e tópica(39-41) e a melhora da qualidade das soluções de preservação(42-44). O resfriamento do fígado leva à diminuição do consumo de oxigênio e aumenta a tolerância celular à isquemia, devido a redução do metabolismo. Durante a reperfusão do órgão submetido à hipotermia, ocorre diminuição da produção de mediadores inflamatórios - como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1, IL-6) - paralelamente à redução do recrutamento de neutrófilos(28, 41, 45, 46).

A hipotermia e alguns outros meios de preservação já estão bem consolidados. Mais recentemente incorporou-se a perfusão do órgão durante a fase isquêmica(47-50). Nos transplantes em geral, assim como no transplante de fígado, o órgão é submetido à isquemia fria durante a estocagem com solução de preservação, que é a base para a conservação do órgão até o transplante e, à isquemia quente durante a implantação do enxerto, que não deverá exceder uma hora, devido aos danos celulares irreversíveis que se instalam(8, 15) .

De acordo com a literatura, em 1953 Raffucci et al(40), em modelo utilizando hipotermia corporal total em cães, com isquemia hepática de uma hora de duração, demonstrou reduzir mortalidade. Desde então, diferentes estudos e métodos de hipotermia têm sido utilizados em cirurgias hepáticas e adaptadas para aplicação clínica, como por exemplo, a hipotermia corporal total leve e profunda(41), hipotermia hepática tópica(51-53) e irrigação hipotérmica de fluxo contínuo intra-hepática(54), havendo evidências do benefício da hipotermia na redução do consumo de oxigênio e da taxa metabólica celular, diminuindo a ativação da transcrição e síntese de proteínas

inflamatórias, aumentando a viabilidade do tecido isquêmico hepatocelular e promovendo preservação histológica.

Há evidências já bem estabelecidas de que tanto a hipotermia leve (33-35°C) quanto a hipotermia moderada (30-33°C), promovem proteção contra as lesões secundárias à IR hepática. Esses efeitos são atribuídos à redução do metabolismo hepático, da necessidade de oxigênio para as funções celulares, impedindo deste modo, o desencadeamento da cascata inflamatória, iniciada pela ativação de neutrófilos e produção de espécies reativas de oxigênio. A hipotermia é capaz de suprimir parcialmente a ativação dos neutrófilos e, a partir disso, toda cascata inflamatória fica temporariamente suspensa (41). É conhecido que as células endoteliais sinusoidais são mais sensíveis à isquemia e que 30 minutos de isquemia são suficientes para desencadear apoptose. Elas são, portanto, as mais sensíveis a se beneficiar da hipotermia. Uma hora de isquemia hipotérmica seguida de reperfusão, produz apoptose tanto de células endoteliais sinusoidais quanto de hepatócitos, com a presença de características histológicas típicas, como condensação do núcleo e citoplasma, edema citoplasmático, corpos apoptóticos típicos nos fagócitos. As caspases são os mediadores celulares chave da apoptose, após a reperfusão(37).

O tempo de isquemia fria é considerado a partir do momento da retirada do órgão do doador, submersão em meio de preservação sob hipotermia, até o início da implantação do enxerto no receptor; no entanto não está determinado até o momento, qual o tempo ideal de isquemia fria para órgãos sólidos. Os protocolos de recomendação variaram bastante nos últimos anos, desde 8 a 12 horas para os enxertos hepáticos, até 24 horas para os renais. As principais complicações observadas são vasculares, do trato biliar e, as relativas à

síndromes reperfusionais. Tais complicações não estariam relacionadas à idade do doador, nem à idade ou escore MELD do receptor, mas ao tempo prolongado de isquemia fria hepática, sugerindo que um tempo superior a 6 horas de isquemia fria, pode implicar alto risco de desenvolvimento de complicações pós transplante(26) .

Outro aspecto a ser considerado, são os mecanismos fisiológicos através dos quais, a hipotermia previne a instalação da resposta inflamatória no fígado, exercendo proteção contra as lesões secundárias à IR hepática. Tem sido sugerido que a hipotermia altera a resposta inflamatória por meio da redução do acúmulo de neutrófilos no parênquima hepático e da menor produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , interleucina 1- $\beta$  e de CXC quimiocinas, como a MIP-2. A hipotermia demonstrou preservar a arquitetura celular hepática, impedindo a produção de edema, infiltração de células inflamatórias e necrose, evitando a ocorrência de lesão secundária à IR hepática(53).

Foram empregados em pesquisa outros meios, como o pré-condicionamento isquêmico e realizadas intervenções farmacológicas como o uso de superóxido dismutase(22), catalase, glutathione, antioxidantes(alfa tocoferol<sup>42</sup>, alopurinol(55,56), diazóxido(57), anticolinérgicos(58), pentoxifilina(59), óxido nítrico e adenosina(60)), o anestésico inalatório sevoflurane(61), com o objetivo de intervir em fases do processo bioquímico que ocorre na isquemia/reperfusão hepática, com resultados favoráveis, reduzindo lesões secundárias. A solução salina hipertônica, por sua vez, demonstrou benefícios em vários estudos, em modelos de sepse, choque hemorrágico(62, 63), trauma e isquemia/reperfusão de órgãos(33, 64) com

excelentes resultados, reduzindo a resposta inflamatória, promovendo restauração volêmica e estabilização hemodinâmica.

A solução salina hipertônica a 7,5% (SSH), usada numa dose padrão de 4ml/kg de peso corporal, como fluido de ressuscitação no paciente grave, apresentou propriedades antioxidantes e efeito protetor na microcirculação do fígado submetido a isquemia quente, também descrito em modelo de choque hemorrágico, tratado com administração de solução salina hipertônica-dextran 6%(62, 63, 65-67). Em estudo utilizando a solução salina hipertônica a 7,5% (SSH), Ke QH et al(33) demonstraram seu efeito anti-inflamatório e capacidade de inibir uma variedade de funções neutrofílicas, quando usado como pré tratamento na IR hepática em ratos(36) , constatando que a SSH podia ativar STAT3 (o mais importante fator de transcrição da IL-10) resultando na indução da liberação endógena de IL-10; concluindo que o pré tratamento com SSH antes da IR pode induzir uma marcada liberação da IL-10, a qual inibe o TNF- $\alpha$  e a infiltração neutrofílica dentro do fígado, protegendo-o da lesão secundária à IR hepática, demonstrando que o uso da SSH pode ser uma boa estratégia como prevenção da lesão de IR hepática.

Vários estudos utilizando a solução salina hipertônica demonstraram efeitos benéficos hemodinâmicos e anti-inflamatórios, quando comparada ao uso de ringer lactato ou soro fisiológico, em situações nas quais ocorreram alterações do fluxo sanguíneo, seja a nível sistêmico ou local, promovendo restabelecimento do volume circulatório, do débito cardíaco, da pressão arterial média, com conseqüente redução do dano celular secundário ao hipofluxo e diminuição da liberação de agentes pró-inflamatórios, responsáveis pela cadeia

oxidativa que resulta em morte celular e falência múltipla de órgãos(62, 63, 67, 68).

Como bem evidenciado em trabalho anterior, realizado no LIM-37 da FMUSP, em modelo de isquemia hepática normotérmica, a solução salina hipertônica tem importante efeito benéfico, promovendo uma restauração imediata dos parâmetros hemodinâmicos (PAM e DC) devido à sua capacidade de expansão volêmica bem documentada, bem como por apresentar ação osmótica, reduzindo edema celular e intersticial, gerando num segundo momento, melhora circulatória generalizada, otimizando a entrega de O<sub>2</sub> e carregando os produtos ácidos resultantes do metabolismo e, principalmente, reduzindo lesões secundárias a IR hepáticas(69).

A proposta do presente estudo é avaliar se o uso da solução salina hipertônica a 7,5%, administrada em ratos submetidos a isquemia hepática, quando associado a hipotermia loco-regional, confere benefícios adicionais na macro e microcirculação, o que pode ser demonstrado através da redução da liberação de fatores inflamatórios e da lesão hepatocelular.



## **2. OBJETIVO**

Avaliar se a administração da solução salina hipertônica a 7,5%, associada a hipotermia regional do fígado em ratos, é capaz de reduzir a lesão secundária à isquemia/reperfusão hepática, quando utilizada antes da isquemia ou antes da reperfusão.

### **3. MÉTODOS**

Este estudo teve início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o Protocolo de Pesquisa nº382/12, sendo realizado no Laboratório de Investigação Médica – LIM-37 da Disciplina de Transplante de Órgãos do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### **3.1 Animais de experimentação**

Foram estudados 50 ratos machos Wistar, com peso entre 230 e 310g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos no LIM-37, em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada entre 20 e 23°C e ciclo claro/escuro de 12/12h, alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA, Paraná, BR), e hidratados com água filtrada ad libitum. Os animais foram distribuídos em 5 grupos de 10 animais para avaliação hemodinâmica e laboratorial.

#### **3.2 Desenho experimental**

### **3.2.1 Anestesia, procedimentos cirúrgicos e cuidados pós-operatório**

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália), 30 mg/kg, e cloridrato de xylazina 2% (Rompum®, Bayer), 30 mg/kg. Os animais foram submetidos a intubação orotraqueal e ventilados com um volume corrente de 0,08 ml / g de peso corporal, frequência respiratória de 60/min, e FiO<sub>2</sub> de 0,50 (Small Animal Ventilator model 683; Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). Durante todo o procedimento, os animais foram aquecidos com lâmpada halogênica de 45W e 127V. A temperatura corpórea, monitorizada por termômetro retal digital (YSI Precision 4000A Thermometer, USA), mantida entre 35 e 37°C (Figura 1).

Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos anestesiados com doses adicionais de cetamina 5%, 30 mg/kg, e cloridrato de xylazina 2%, 15mg/kg.

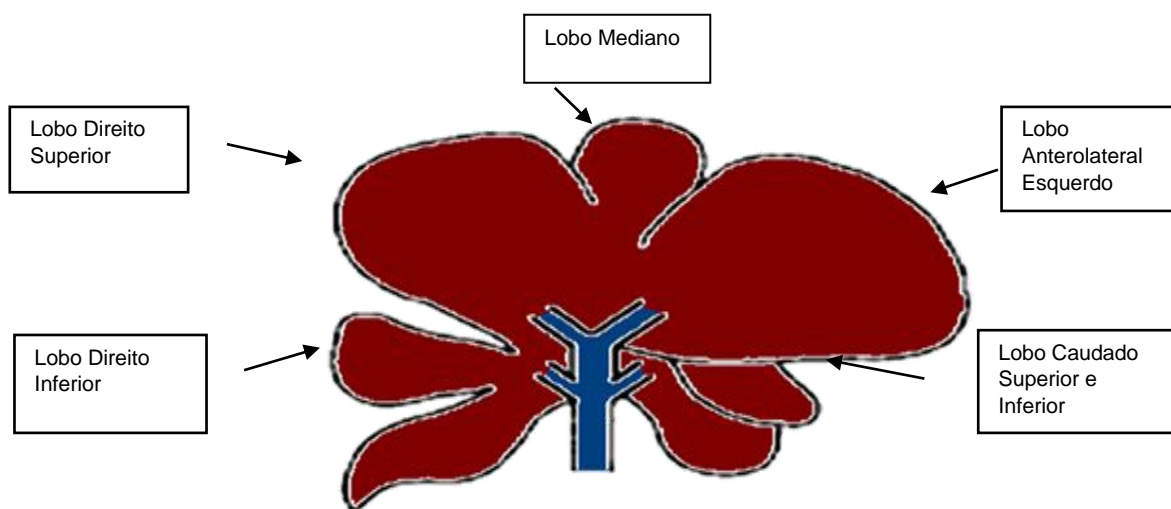
Realizada laparotomia mediana, estendendo-se por aproximadamente 4cm, a partir do apêndice xifóide. Recordamos que a anatomia hepática dos ratos wistar é diferente da humana, o fígado dos ratos é composto de seis lobos, um lobo mediano e antero-lateral esquerdo, os lobos superior e inferior direito, caudado superior e inferior (Figura 2). Foi utilizado um modelo de isquemia hepática parcial para evitar a congestão intestinal. Este método consiste no pinçamento do pedículo comum dos lobos mediano e antero-lateral esquerdo, o qual foi isolado e ocluído com pinça microvascular atraumática, levando à isquemia de 70% do fígado, conservando o fluxo da veia porta direcionado para os lobos hepáticos direito (superior e inferior) e caudado

(superior e inferior), evitando a congestão intestinal e permitindo análise dos efeitos sistêmicos secundários a I/R hepática de forma isolada. (Figura 2).

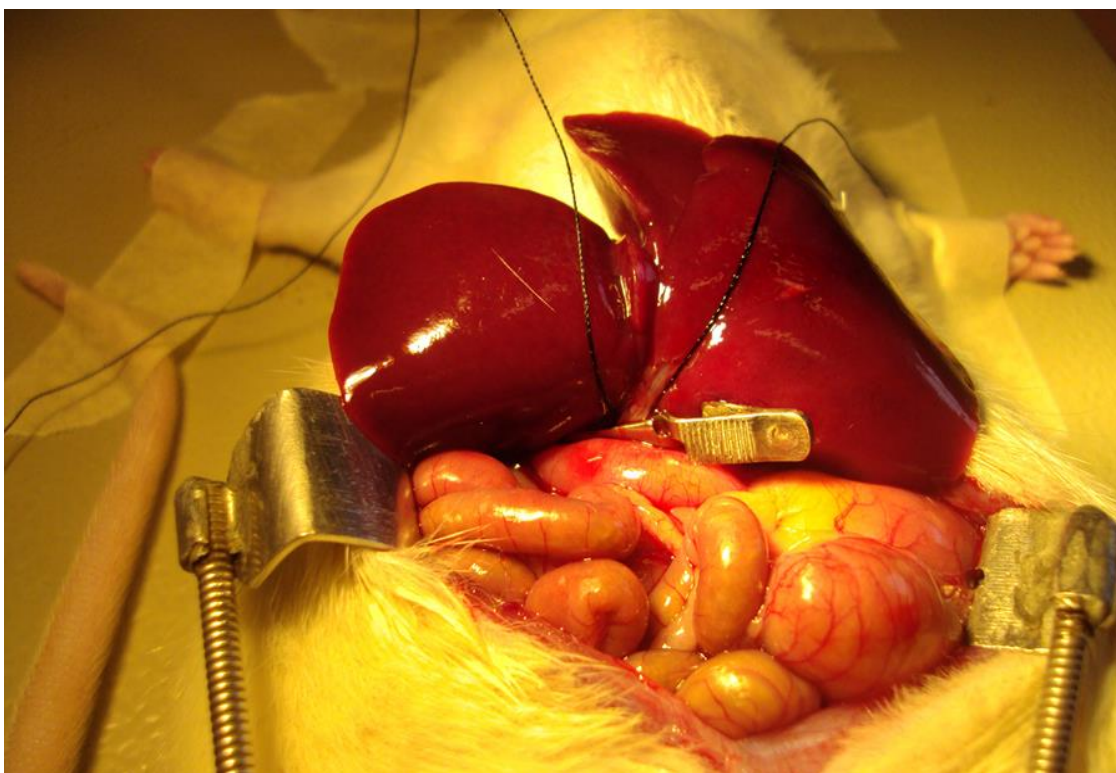


**Figura 4.** Procedimento cirúrgico com animais sob anestesia geral, entubados, conectados a ventilação mecânica, sobre leito aquecido com temperatura controlada sob monitorização corporal via retal. Animal à esquerda da imagem, submetido a hipotermia do fígado com coxins de gelo moído sobre placa de poliestireno, com monitor local de temperatura (6,7°C).

A incisão abdominal foi coberta com gases umedecidas com soro e cada animal recebeu 4 ml de soro fisiológico por via subcutânea para evitar a desidratação durante o experimento.



**Figura 5.** Descrição anatômica dos lobos hepáticos do fígado de ratos Wistar.



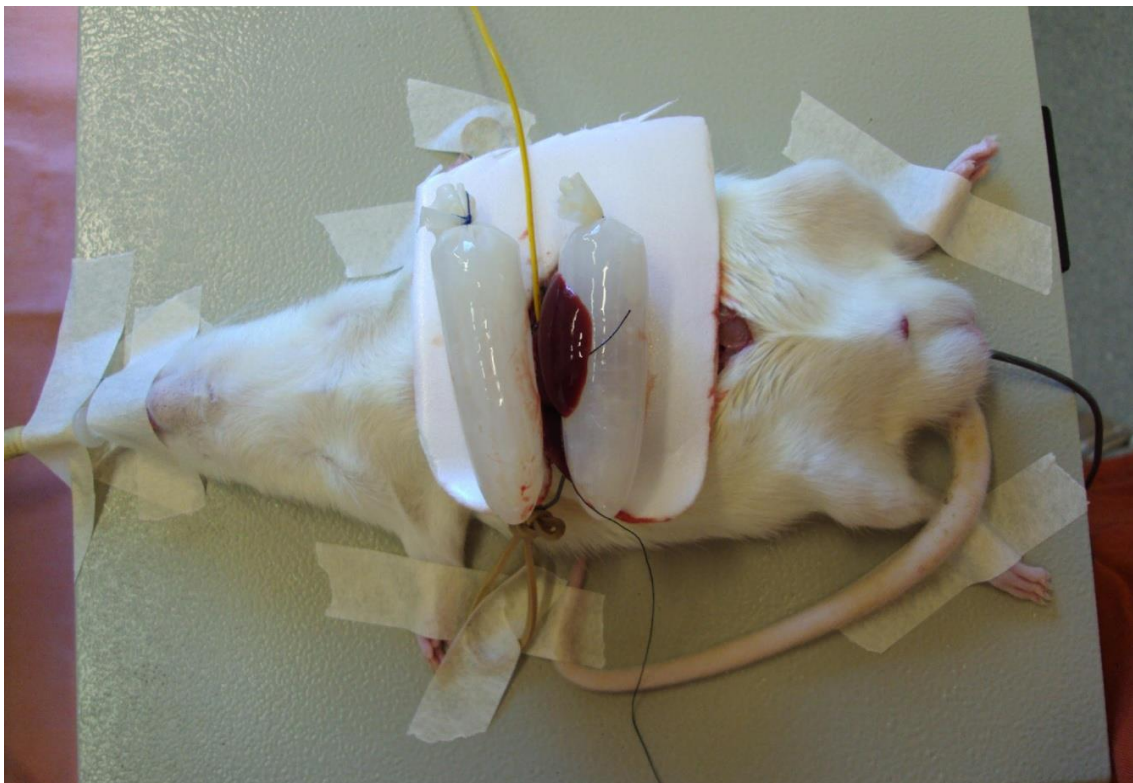
**Figura 6.** Lobos hepáticos luxados para cima, isolamento do pedículo hepático (fio algodão azul 3-0) comum dos lobos medianos e lateral esquerdo e oclusão com clampe vascular.

Após 40 minutos de isquemia quente ou fria, a pinça foi removida, permitindo a reperfusão do fígado. Logo após o início da reperfusão foi

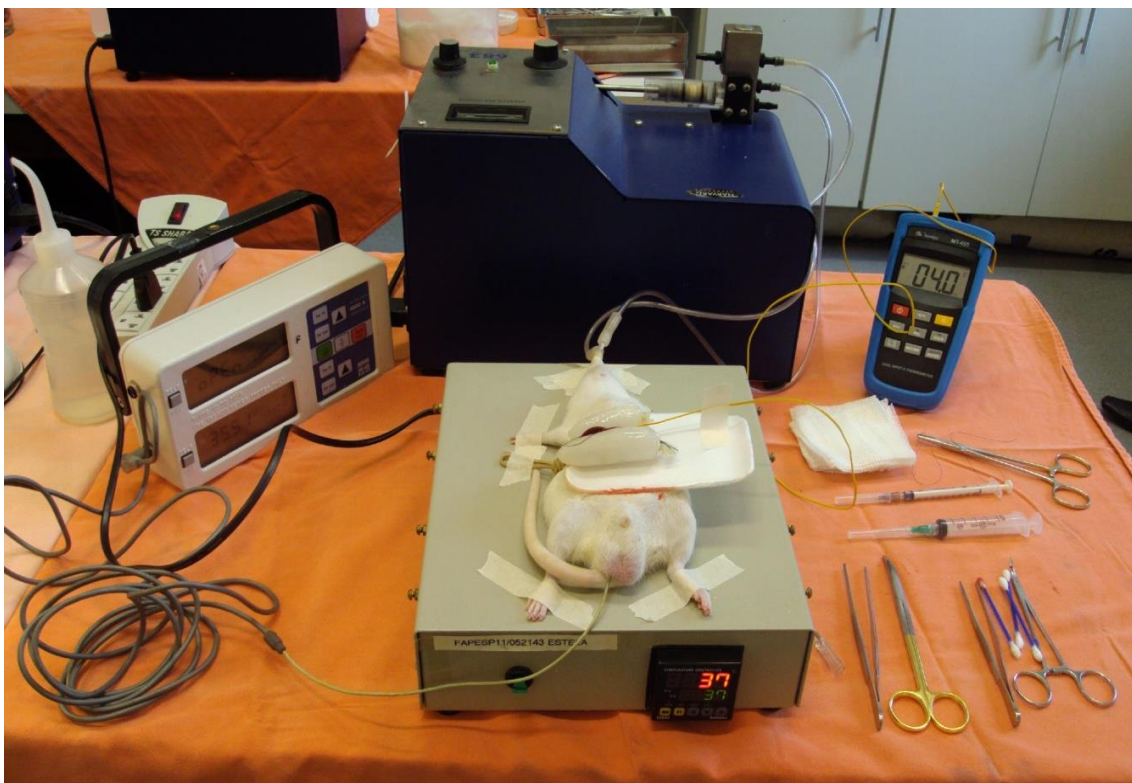
realizada a remoção dos lobos direito e caudado não submetidos a isquemia. O pedículo de cada lobo foi ocluído com ligadura com fio de algodão 3.0, e em seguida realizada a ressecção dos mesmos. A incisão foi fechada com sutura contínua com Mononylon® 3.0.

### **3.2.2 Indução da hipotermia do fígado**

Foi utilizado modelo inédito de hipotermia loco-regional desenvolvido no LIM-37, pelo Dr. E. Abdo et al(70), com placa de poliestireno para isolar os lobos isquêmicos submetidos a hipotermia do corpo do animal, evitando a diminuição da temperatura corporal. Os lobos isquêmicos mediano e anterolateral esquerdo foram envolvidos por dedos de luvas (2,5 a 3 cm de comprimento) preenchidos de gelo moído. A temperatura dos lobos isquêmicos foi mantida em torno de 10°C (com uma variação aceitável entre 4 e 10°C) e monitorada com termômetro digital de superfície, conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 7).



**Figura 7.** Animal anestesiado, entubado, fixado sobre cama térmica, submetido a isquemia sob hipotermia dos lobos mediano e anterolateral esquerdo do fígado, com gelo tópicos em dedos de luva, isolados do corpo por placa de poliestireno branca, controle da temperatura local (termômetro digital de superfície - fio amarelo) e da corporal (termômetro retal - fio preto).



**Figura 8.** Experimento no LIM-37 com animal anestesiado, entubado, conectado ao respirador, fixado sobre cama aquecida à 37°C, laparotomizado, submetido a isquemia sob hipotermia dos lobos mediano e anterolateral esquerdo do fígado, com coxins de gelo em dedos de luva, isolados do corpo com placa de poliestireno, monitorização da temperatura regional hepática (monitor azul) e corporal (monitor branco), materiais cirúrgicos, seringas para injeção de SSH endovenosa e de SF 0,9% subcutânea.

### 3.2.3 Período pós-reperfusão do fígado

No pós-operatório, os animais foram acondicionados em gaiola individual com água ad libitum, sendo administrada analgesia com tramadol 5 a 10 mg/kg por via subcutânea. Quatro horas após a reperfusão do fígado, os animais foram novamente anestesiados e submetidos a ventilação mecânica.

Realizada dissecação e cateterização da artéria carótida comum direita com cateter de polietileno (PE50), figura 5, para registro da pressão arterial



(MP150 Starter, Biopac Systems Inc., Ca, USA), Figura-7. Foi realizada coleta de sangue e tecidos para análise.



**Figura 9.** Animal sob anestesia, entubado, cânula orotraqueal e extensor fixados ao leito, cateter vascular inserido em arterial carótida direita após dissecção, para medidas hemodinâmicas invasivas e coleta de sangue arterial para análises.

Ao final do experimento, os animais sofreram eutanásia por exsanguinação pela secção da aorta e da veia cava inferior, sendo descartados em saco plástico branco próprio e encaminhados para incineração conforme as normas técnicas da Instituição seguindo as normas atuais de uso de animais em laboratório de pesquisa.

### 3.3 Grupos de estudo

Os animais foram randomizados em 5 grupos de estudo:

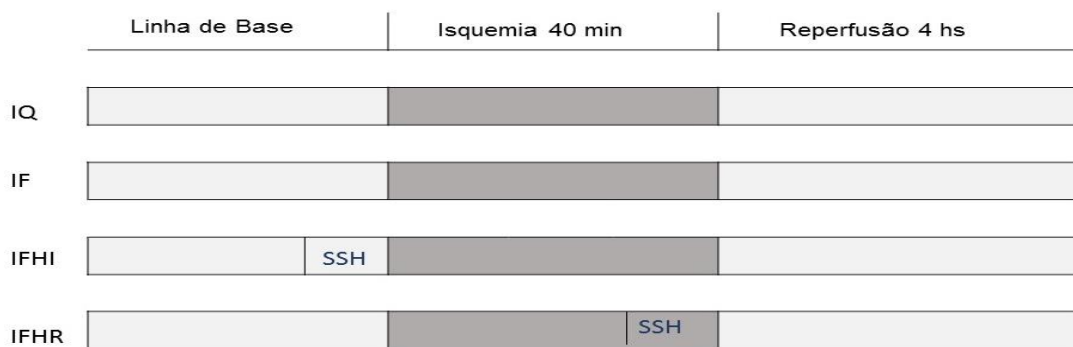
**a) Grupo Sham (S):** animais submetidos à laparotomia e manipulação leve do fígado.

**b) Grupo Controle da Isquemia Quente (IQ):** animais submetidos a 40 min de isquemia parcial quente do fígado, seguida de ressecção dos lobos direito e caudado não isquêmicos.

**c) Grupo Controle da Isquemia com Hipotermia (IF):** animais submetidos a 40min de isquemia com hipotermia em torno de 10°C, seguida da ressecção dos lobos não isquêmicos.

**d) Grupo Isquemia com Hipotermia + Solução Salina Hipertônica a 7,5% antes da Isquemia (IFHI):** animais tratados com NaCl 7,5%, 4ml/kg de peso por via endovenosa, 10 minutos antes da isquemia, submetidos a isquemia com hipotermia durante 40min., com posterior ressecção dos lobos não isquêmicos.

**e) Grupo Isquemia com Hipotermia + Solução Salina Hipertônica a 7,5% antes da Reperfusão (IFHR):** animais submetidos a 40 min de isquemia com hipotermia e tratados com NaCl 7,5%, 4 ml/kg de peso por via endovenosa, 10minutos antes da reperfusão, com posterior ressecção dos lobos não isquêmicos.



**Figura 10.** Delineamento do experimento: grupos de animais do estudo submetidos a 40 minutos de isquemia quente (IQ) ou fria (IF, IFHI e IFHR) e 4h de reperusão. Grupos IFHI e IFHR receberam SSH a 7,5%, 10 minutos antes da isquemia e da reperusão, respectivamente.

### 3.4 Parâmetros avaliados

#### 3.4.1 Análise bioquímica

As transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram avaliadas como indicadores de lesão hepática. A quantificação de AST e ALT foi realizada pelo método ultravioleta otimizado (COBAS MIRA, Roche) de acordo com a International Federation. Os resultados expressos em unidades por litro. A gasometria arterial, glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), cálcio, cloreto, sódio e potássio (mEq/L) foram quantificados pelo analisador de gases ABL800 Flex (Radiometer Medical ApS, Dinamarca). As amostras de sangue para análise foram colhidas 4 horas após a reperusão hepática.

### **3.4.2 Análise histológica do fígado**

Os fragmentos do tecido hepático, fixados em solução de formol a 2% e corados com hematoxilina e eosina, foram submetidos à análise histológica por microscopia óptica, por um único patologista sem conhecimento dos grupos estudados. Foram analisados os seguintes parâmetros: tumefação, retração e esteatose hepatocelular, necrose de coagulação, inflamação lobular, inflamação portal e celularidade sinusoidal. Cada parâmetro foi graduado em ausente (0), leve (1), moderado (2) e grave (3), sendo que a necrose teve peso 3, conforme modelo proposto por Quireze et al(70), demonstrado no quadro abaixo. O material para análise histológica foi colhido 4 horas após o início da reperfusão.

**Tabela 1.: Graduação histológica de lesão de isquemia/reperfusão hepática segundo Quireze et al(70)**

Parâmetro	Graduação	Pontuação
Tumefação hepatocelular	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Grave	3
Retração hepatocelular	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Grave	3
Esteatose hepatocelular	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Grave	3
Necrose de coagulação	Ausente	0
	Leve	3 (1 x 3)
	Moderada	6 (2 x 3)
	Grave	9 (3 x 3)
Inflamação lobular	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Grave	3
Inflamação portal	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Grave	3
Celularidade sinusoidal	Ausente	0
	Leve	1
	Moderada	2
	Grave	3

### 3.4.3. Análise de citocinas

O TNF- $\alpha$  e as interleucinas IL-6 e IL-10 foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA, Bio-Rad) nas amostras de plasma 4 horas após o

início da reperfusão do fígado. Os resultados foram expressos em pictogramas por mililitro.

#### **3.4.4 Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica no tecido hepático foi quantificada 4 horas após o início da reperfusão pela determinação da concentração de malonaldeído (MDA) por meio da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram homogeneizadas em KCL, centrifugadas e, no sobrenadante, foi adicionada uma solução contendo ácido tiobarbitúrico, duodecilsulfato de sódio, ácido acético glacial e água destilada. A mistura foi aquecida a 90°C por 45 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 10 minutos. As concentrações dos produtos da peroxidação lipídica foram expressas pelo TBARS. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/ mg de proteína.

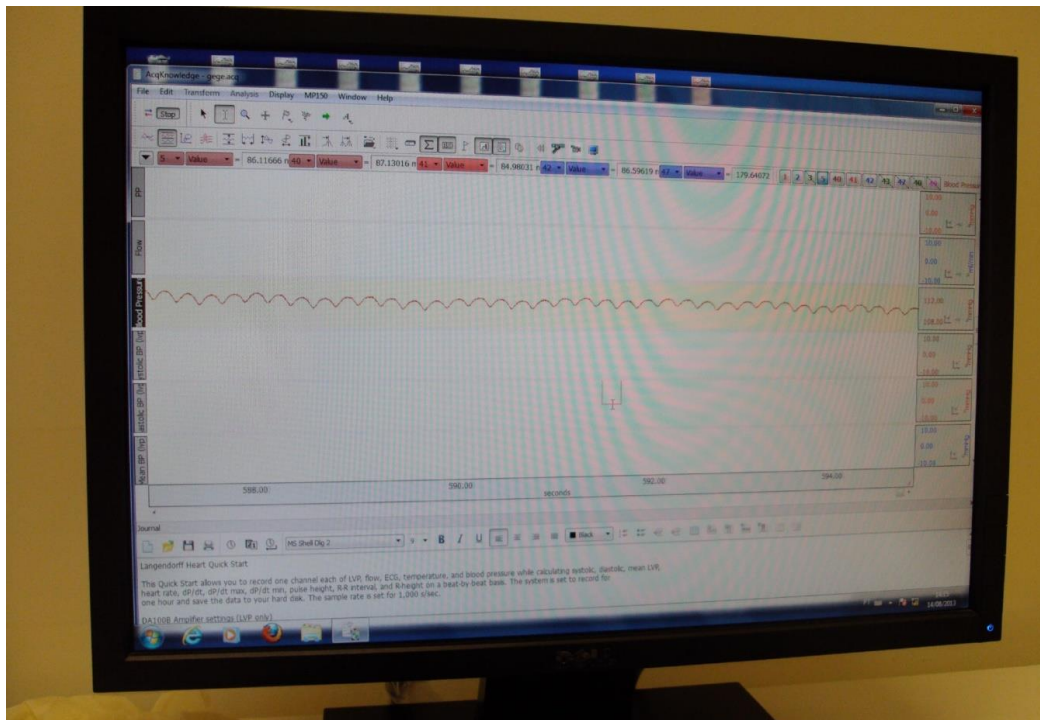
#### **3.4.5 Análise da atividade da mieloperoxidase pulmonar**

Ao final do experimento, através da cateterização da artéria pulmonar com cateter de 2,0mm de diâmetro (Silastic Dow Corning, nº602.175), e lavagem do pulmão com 50ml de solução salina fisiológica, administrada com bomba de infusão na velocidade de 10ml/min, fragmentos de pulmões foram excisados e encaminhados para extração de azul de Evans e quantificação da mieloperoxidase pulmonar, a qual reflete a quantidade de neutrófilos

sequestrados no mesmo. Realizou-se a homogeneização com o homogeneizador Polytron destas amostras, utilizando-se tampão PBS pH 6,0, com 5mM EDTA e 0,5% de hexadecil, após submissão à ultrassom (40Hz), foram centrifugadas a 3000g/min; sendo então realizada quantificação da MPO, por densidade óptica (DO) a 490nm, no sobrenadante, a qual é produto de decomposição da H<sub>2</sub>O mediante O-dianisidina (Sigma), com resultados expressos em DO a 490nm.

#### **3.4.6 Avaliação de parâmetro hemodinâmico**

As medidas de pressão arterial média (mmHg) foram registradas pelo MP150 Starter System (Biopac Systems Inc., Ca, USA) por meio cateter de pressão arterial invasiva. Esses parâmetros foram medidos 4h após a reperfusão do fígado.



**Figura 11.** Monitor Hemodinâmico observando-se no centro da tela, curva da PAM.

### 3.4.7 Análise estatística

Foi realizado uma análise descritiva dos dados através do cálculo das medidas de resumo (média, desvio-padrão, mediana e quartis) e por meio de gráficos do tipo box-plots. O teste de comparação entre dois grupos (três ou mais) foi realizado por meio do teste *t-Student* (ANOVA), para as variáveis que seguem distribuição normal o teste de Anderson-Darling e, para as variáveis que não seguem normalidade, foi utilizado o teste de Mann Whitney (Kruskal-Wallis) para as variáveis homogêneas teste de Bartlette, para as variáveis heterogêneas, teste de Brunel Manzel (Levene).

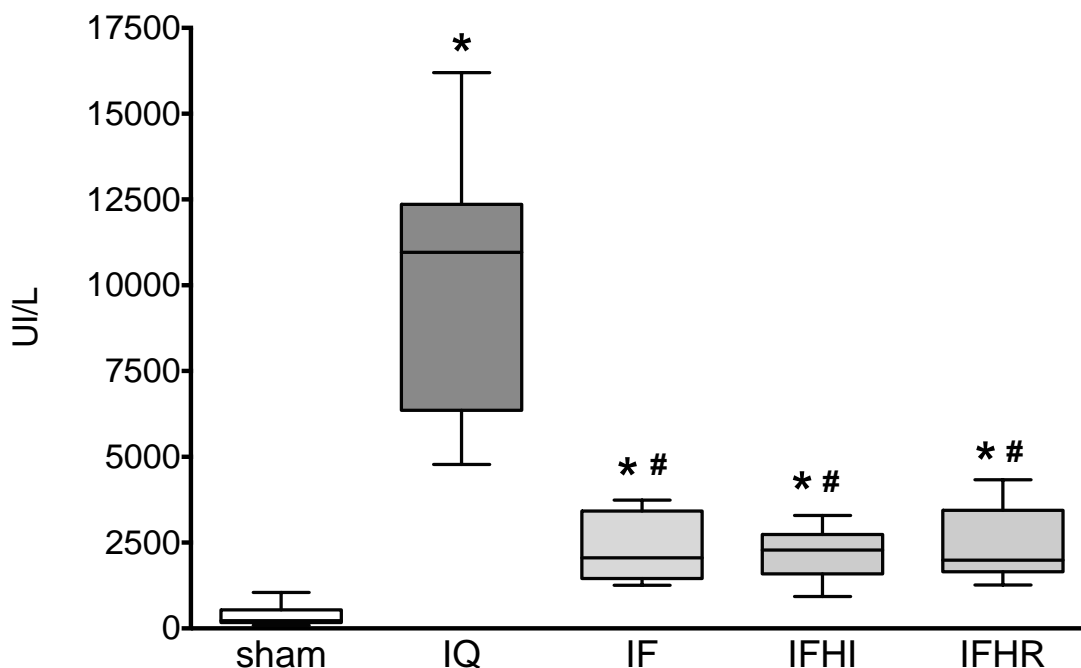


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise Bioquímica

#### 4.1.1. Transaminase aspartato aminotransferase (AST)

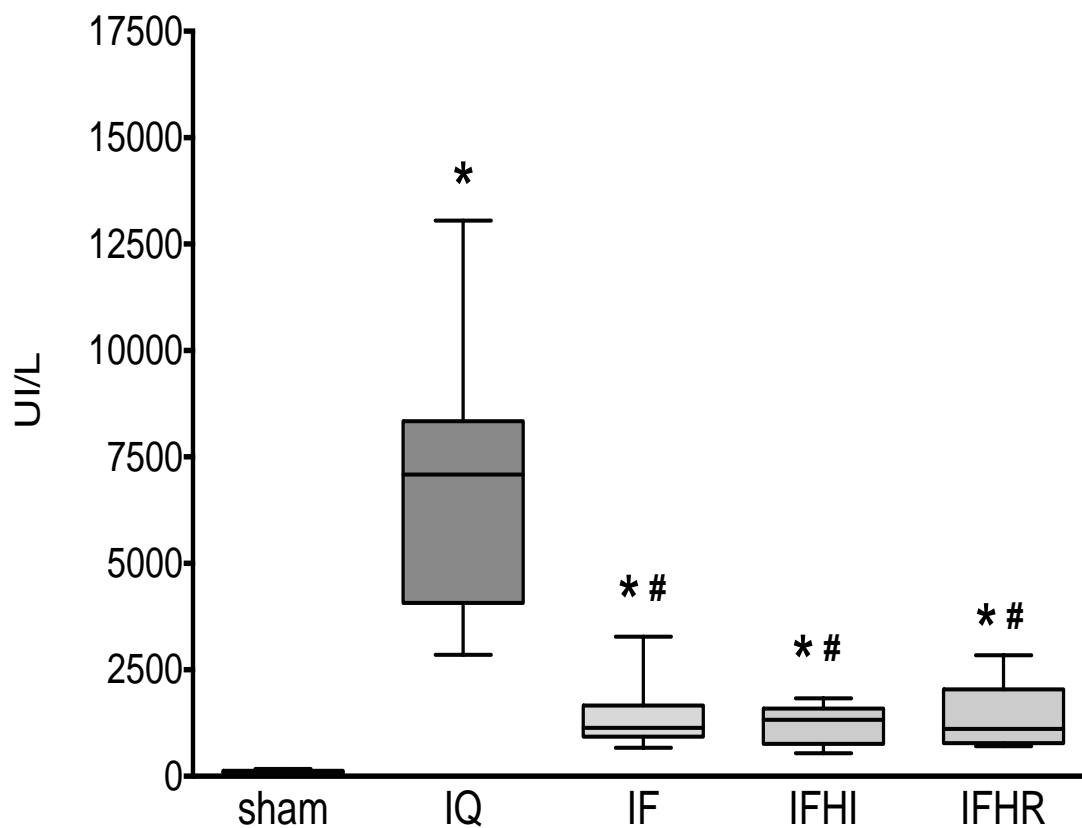
Os níveis de AST (Gráfico1) dos animais do grupo sham ( $356 \pm 308$  UI/L) foram significativamente menores em comparação aos níveis dos animais dos grupos submetidos a isquemia IQ ( $9935 \pm 3764$  UI/L;  $p < 0,0001$ ), IF ( $2360 \pm 990$  UI/L;  $p = 0,022$ ), IFHI ( $2182 \pm 728$  UI/L;  $p = 0,035$ ) e IFHR ( $2387 \pm 1046$  UI/L;  $p = 0,016$ ). Além disso, os animais do grupo IQ apresentaram níveis de AST significativamente maiores em comparação ao grupo IF ( $p = < 0,001$ ), IFHI ( $< 0,0001$ ) e IFHR ( $< 0,0001$ ). Entretanto, não houve diferenças significativas na comparação entre os grupos submetidos a isquemia fria.



**Gráfico 1.** Níveis séricos de AST 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ.

#### 4.1.2. Transaminase alanina aminotransferase (ALT)

Os níveis de ALT dos animais do grupo sham ( $100 \pm 38$  UI/L) foram significativamente menores em comparação aos níveis dos animais dos grupos submetidos a isquemia IQ ( $6871 \pm 3079$  UI/L;  $p < 0,0001$ ), IF ( $1409 \pm 768$  UI/L;  $p = 0,016$ ), IFHI ( $1205 \pm 435$  UI/L;  $p = 0,028$ ) e IFHR ( $1373 \pm 717$  UI/L;  $p = 0,021$ ). Além disso, os animais do grupo IF apresentaram níveis de ALT significativamente menores em comparação ao grupo IQ ( $p = 0,031$ ). Não houve diferenças significativas nas comparações entre os grupos submetidos a isquemia fria (Gráfico 2).

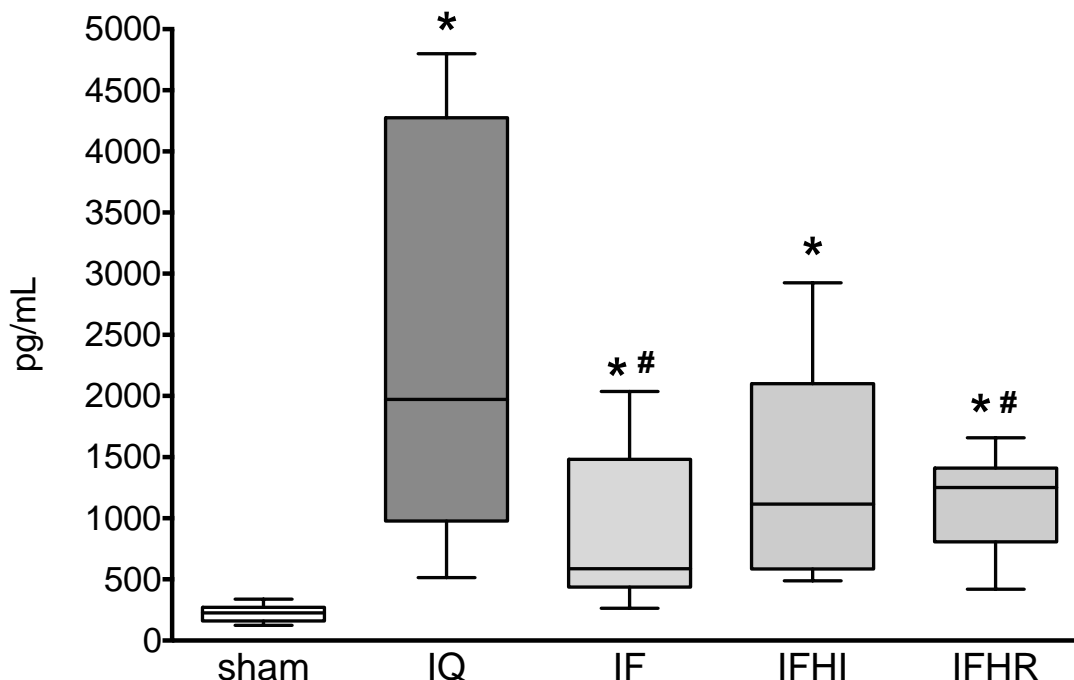


**Gráfico 2.** Níveis séricos de ALT 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ

## 4.2. Análise dos Mediadores Inflamatórios

### 4.2.1. Interleucina-6 (IL-6)

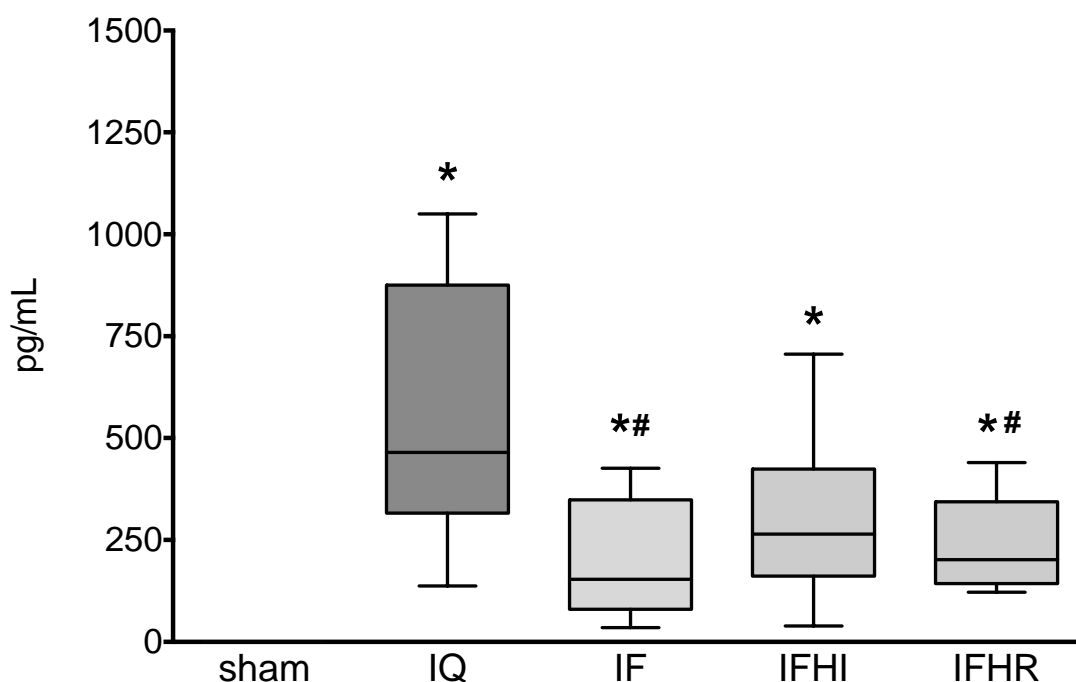
Os níveis de IL-6 (Gráfico 3) dos animais do grupo sham ( $223 \pm 74$  pg/mL) foram significativamente menores em comparação aos níveis dos animais dos grupos submetidos a isquemia IQ ( $2405 \pm 1618$ pg/mL;  $p < 0,0001$ ), IF ( $923 \pm 618$  pg/mL;  $p < 0,0001$ ), IFHI ( $1390 \pm 861$ pg/mL;  $p = 0,0001$ ) e IFHR ( $1139 \pm 401$  pg/mL;  $p = 0,0001$ ). Adicionalmente o grupo IQ apresentou níveis significativamente maiores em comparação aos grupos IF ( $p = 0,0145$ ) e IFHR ( $p = 0,0273$ ). Entretanto, não houve diferenças na comparação entre os grupos submetidos a isquemia fria.



**Gráfico 3.** Níveis séricos de IL-6 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ.

#### 4.2.2. Interleucina 10 (IL- 10)

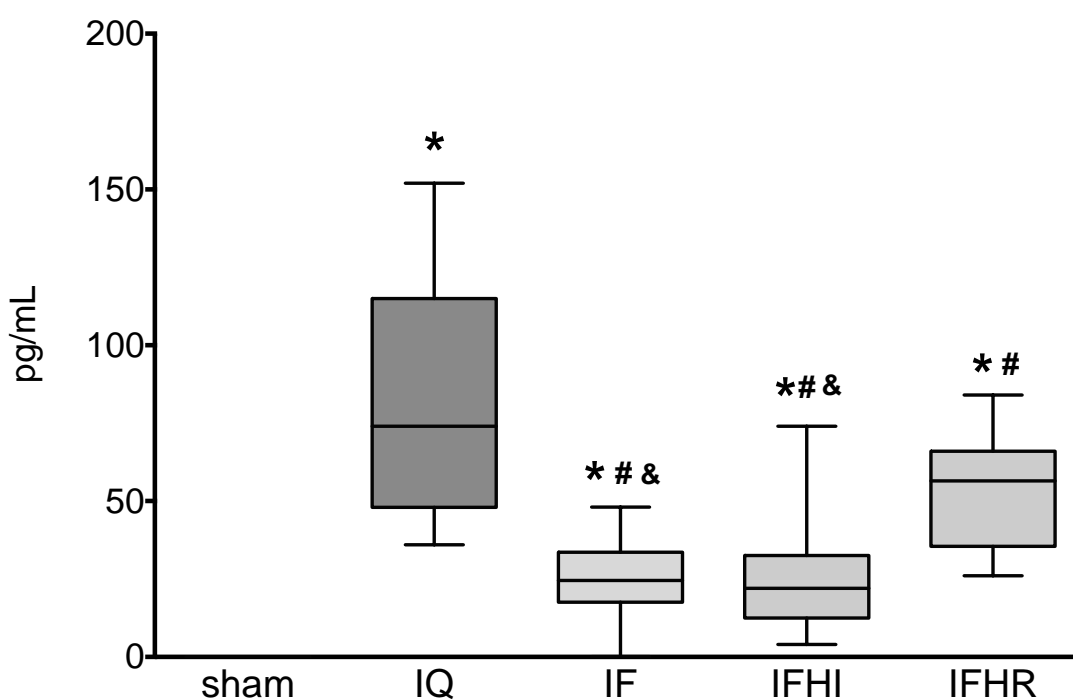
Os níveis de IL-10 (Gráfico 4) dos animais do grupo sham (0 pg/mL) foram significativamente menores em comparação aos níveis dos animais dos grupos submetidos a isquemia IQ ( $545 \pm 327$ pg/mL;  $p < 0,0001$ ), IF ( $203 \pm 146$  pg/mL;  $P < 0,0001$ ), IFHI ( $308 \pm 198$ pg/mL;  $p < 0,0001$ ) e IFHR ( $241 \pm 121$ pg/mL;  $p < 0,0001$ ). Adicionalmente o grupo IQ apresentou níveis significativamente maiores em comparação aos grupos IF ( $p = 0,001$ ) e IFHR ( $p = 0,013$ ). Entretanto, não houve diferenças na comparação entre os grupos submetidos a isquemia fria.



**Gráfico 4.** Níveis séricos de IL-10 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham; # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ

### 4.2.3. Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )

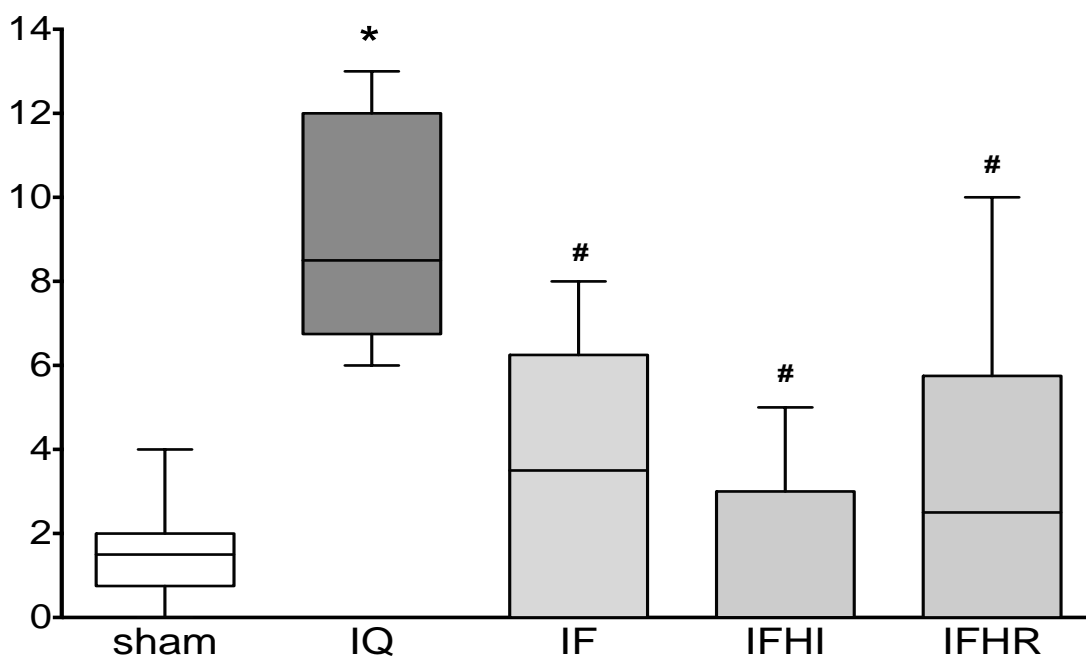
Os níveis de TNF- $\alpha$  (Gráfico 5) dos animais do grupo sham (0 pg/mL) foram significativamente menores em comparação aos níveis dos animais dos grupos submetidos a isquemia IQ ( $83,80 \pm 37,80$  pg/mL;  $p < 0,0001$ ), IF ( $24,30 \pm 13,52$  pg/mL;  $p < 0,0001$ ), IFHI ( $26,20 \pm 21,38$  pg/mL,  $p < 0,0001$ ) e IFHR ( $53,40 \pm 18,25$  pg/mL;  $p = 0,0001$ ). Adicionalmente, os animais do grupo IQ apresentaram níveis de TNF- $\alpha$  significativamente maiores em comparação aos grupos IF ( $p < 0,0001$ ), IFHI ( $p = 0,0005$ ) e IFHR ( $p = 0,0343$ ). Em relação aos grupos submetidos à isquemia fria, o grupo IFHR apresentou níveis de TNF- $\alpha$  significativamente maiores que IF ( $p = 0,003$ ) e IFHI ( $p = 0,006$ ).



**Gráfico 5.** Níveis séricos de TNF- $\alpha$  4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham, # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ, & $p < 0,05$  comparado ao grupo IFHR

### 4.3. Escore Histológico

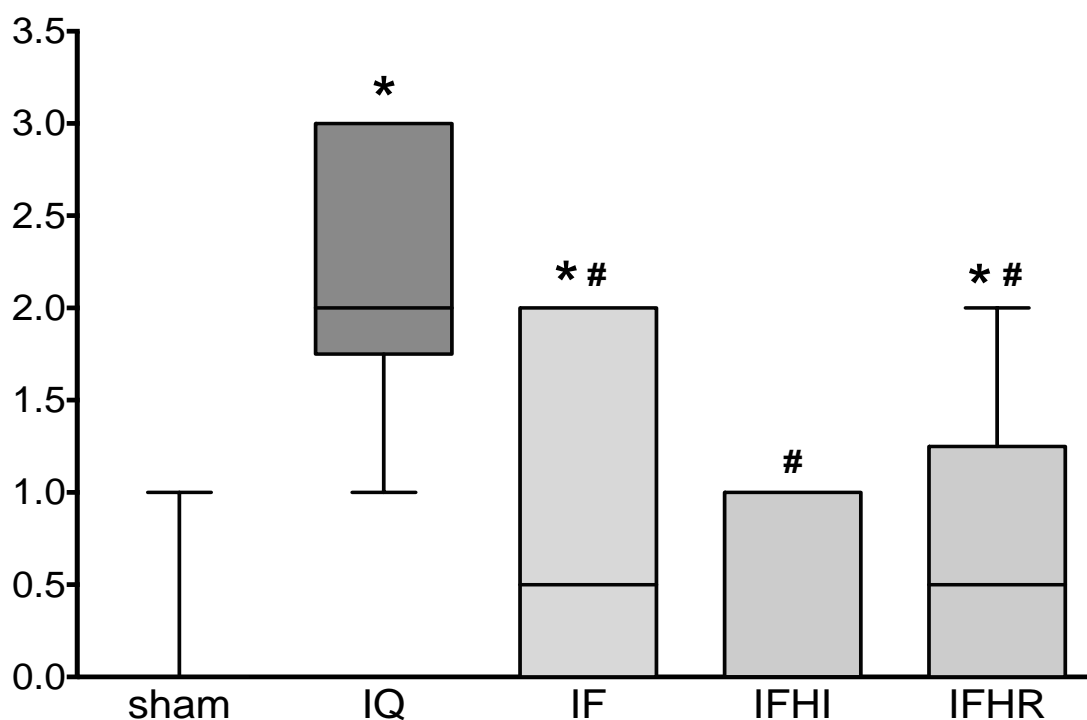
A mediana do escore histológico (Gráfico 6) do grupo sham (1,5; 0–4) foi significativamente menor em comparação ao grupo IQ (8,5; 6–13;  $p < 0,0001$ ), sendo que não houve diferença na comparação do grupo sham com os demais grupos: IF (3,5; 0–8), IFHI (0; 0–5), IFHR (2,5; 0–10). Além disso o grupo IQ apresentou mediana significativamente maior que os grupos IF ( $p < 0,0001$ ), IFHI ( $p < 0,0001$ ) e IFHR ( $p = 0,0006$ ). Não houve diferenças na comparação entre os grupos submetidos a isquemia fria.



**Gráfico 6.** Escore histológico da lesão de reperfusão hepática avaliado 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham, # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ

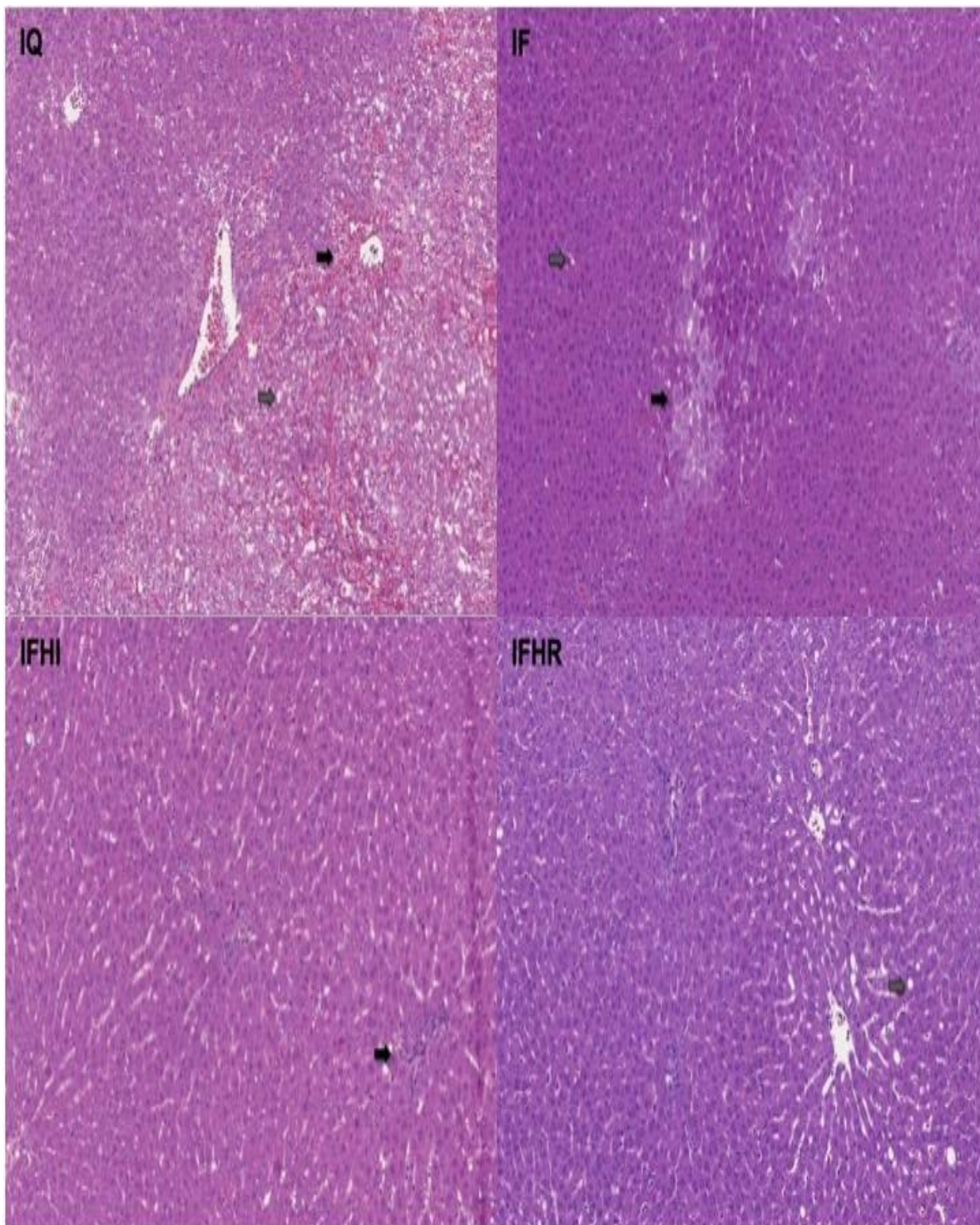
#### 4.3.1. Necrose

O grau de necrose (Gráfico 7) do grupo sham (0; 0–1) foi significativamente menor em comparação ao grupo IQ (2; 1–3;  $p < 0,0001$ ), IF (0,5: 0–2;  $p = 0,0352$ ), e IFHR (0,5: 0–2; 0,0453), mas sem diferença em relação ao grupo IFHI (0: 0–1). Além disso o grupo IQ apresentou mediana significativamente maior que os grupos IF ( $p = 0,0018$ ), IFHI ( $p < 0,0001$ ) e IFHR ( $p = 0,0006$ ). Entretanto, não houve diferenças na comparação entre os grupos submetidos a isquemia fria.



**Gráfico 7.** Grau de necrose hepática avaliada 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo sham, # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ.

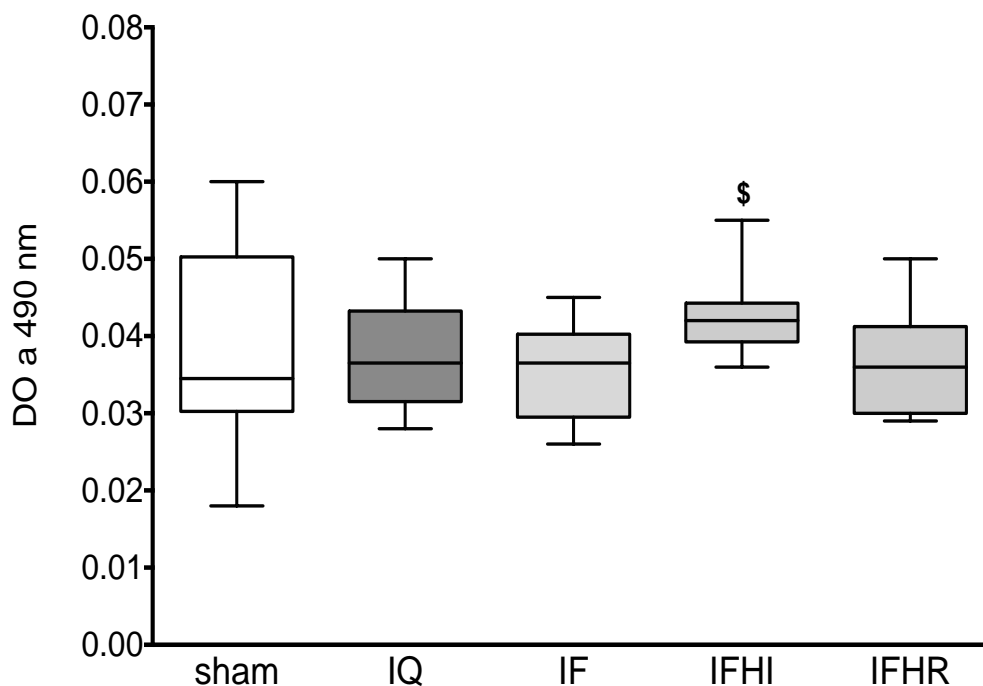




**Figura 12.** Fotos de microscopia óptica, aumento de 40x, coloração HE, demonstrando os seguintes achados histopatológicos secundários ao processo de I/R hepática, dos grupos IQ: infiltrado mononuclear leve, esteatose microgoticular (seta cinza) e necrose de células isoladas (seta preta); grupo IF: esteatose leve e focal (seta cinza), múltiplos focos de necrose (seta preta); grupo IFHI: arquitetura preservada, esteatose leve e focal (seta preta), necrose focal; IFHR: arquitetura preservada, esteatose leve e focal (seta cinza).

#### 4.4. Atividade da Mieloperoxidase Pulmonar (MPO)

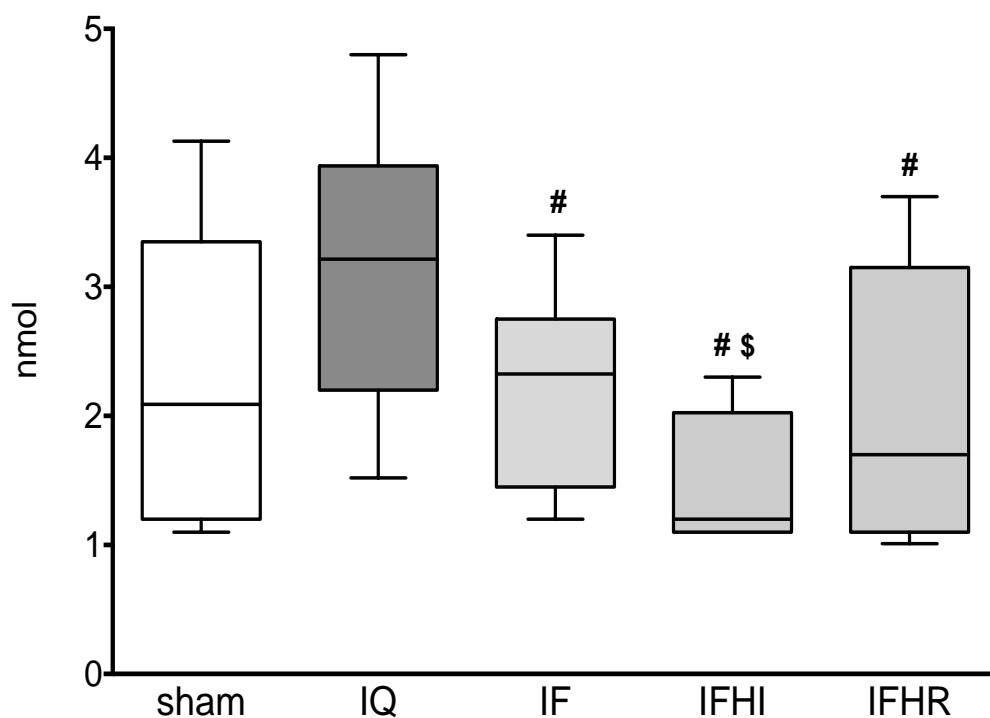
Não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa dos níveis de MPO (Gráfico 8) entre o grupo sham ( $0,038 \pm 0,013$  DO a 490 nm) e os demais grupos: IQ ( $0,0373 \pm 0,007$  DO a 490 nm), IF ( $0,036 \pm 0,006$  DO a 490 nm), IFHI ( $0,042 \pm 0,005$  DO a 490 nm), IFHR ( $0,0367 \pm 0,007$  DO a 490 nm). Entretanto, os níveis de MPO do grupo IFHI foram significativamente maiores que o grupo IF ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 8.** Atividade da MPO avaliada 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \$ $p < 0,05$  comparado ao grupo IF.

#### 4.5. Estresse Oxidativo (MDA)

Não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa dos níveis de malonaldeído (Gráfico 9) entre o grupo sham ( $2,24 \pm 1,08$  nmol) e os demais grupos: IQ ( $3,18 \pm 1,06$  nmol), IF ( $2,17 \pm 0,74$  nmol), IFHI ( $1,47 \pm 0,48$  nmol), IFHR ( $2,10 \pm 1,10$  nmol). Entretanto, o grupo IQ apresentou níveis de malonaldeído significativamente maiores que os grupos IF ( $p=0,0242$ ), IFHI ( $p=0,0002$ ) e IFHR ( $p=0,0394$ ). Além disso, o grupo IFHI apresentou níveis significativamente menores que os do grupo IF ( $p=0,0221$ ).

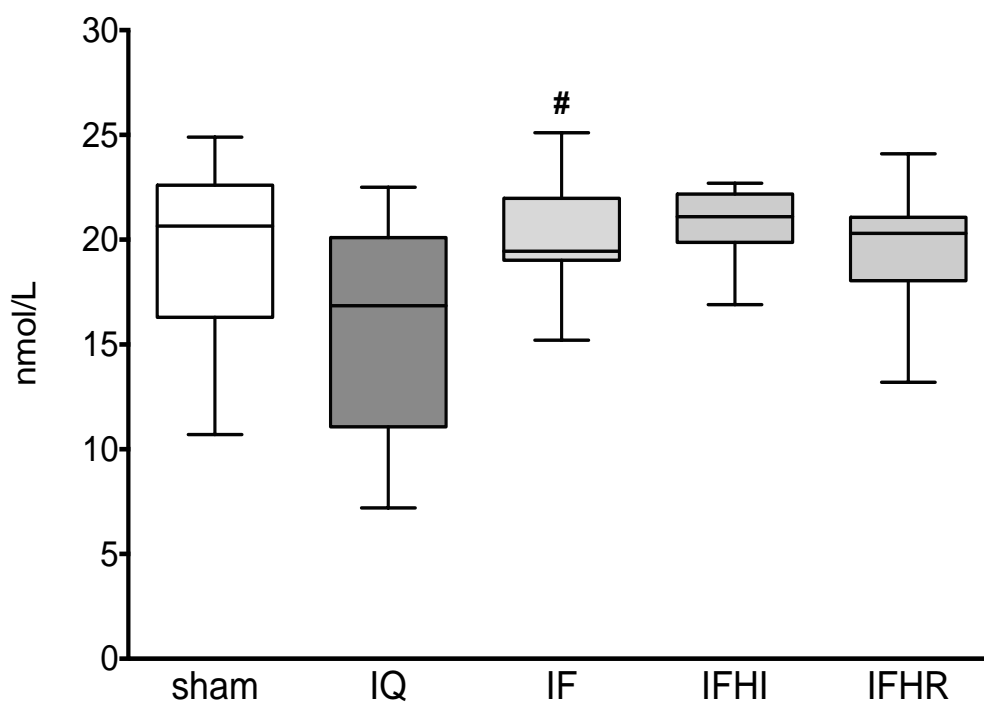


**Gráfico 9.** Os níveis de MDA avaliados no tecido hepático 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da reperusão. N =10 por grupo. # $p<0,05$  comparado ao grupo IQ, \$ $p<0,05$  comparado ao grupo IF

## 4.6. Parâmetros Hemogasométricos

### 4.6.1. Bicarbonato (HCO<sub>3</sub>)

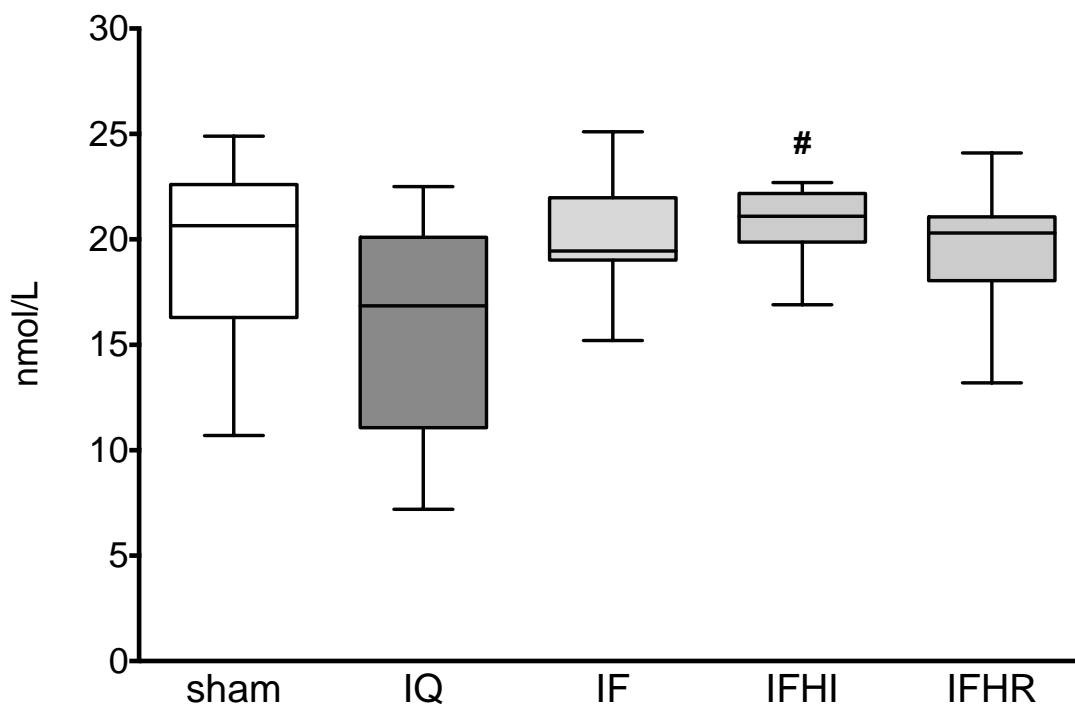
Não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa dos níveis de bicarbonato (Gráfico 10) entre o grupo sham ( $19,4 \pm 4,18$  nmol/L) e os demais grupos: IQ ( $15,9 \pm 5,27$  nmol/L), IF ( $20,1 \pm 2,61$  nmol/L), IFHI ( $20,8 \pm 1,76$  nmol/L), IFHR ( $19,7 \pm 2,96$  nmol/L), nem entre os grupos submetidos a isquemia fria. Entretanto, o grupo IQ apresentou níveis de bicarbonato significativamente menores que o grupo IF ( $p=0,0115$ ).



**Gráfico 10.** Níveis séricos de bicarbonato 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão. N =10 por grupo. # $p<0,05$  comparado ao grupo IQ.

#### 4.6.2. Excesso de Bases (SBE)

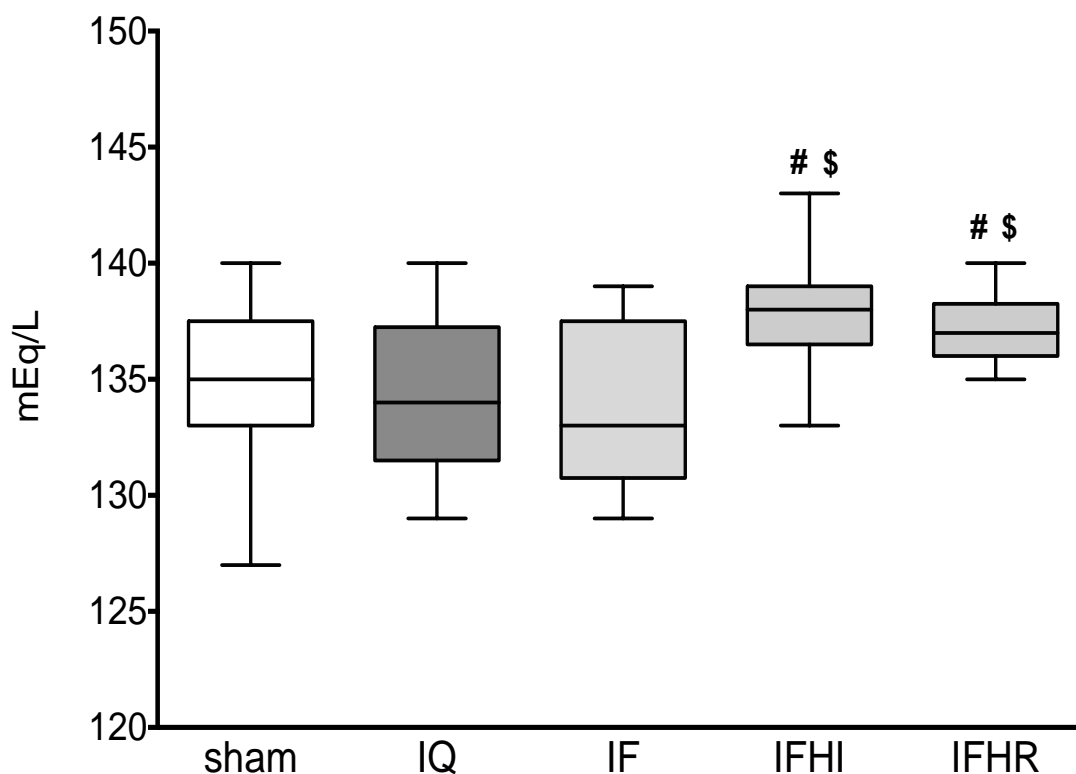
Não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa dos níveis de excesso de bases (Gráfico11) entre o grupo sham ( $19,4 \pm 4,18$  nmol/L) e os demais grupos: IQ ( $15,9 \pm 5,27$  nmol/L), IF ( $20,1 \pm 2,61$  nmol/L), IFHI ( $20,8 \pm 1,76$  nmol/L), IFHR ( $19,7 \pm 2,96$  nmol/L); entre o grupos IQ e IF, ou entre os grupos submetidos a isquemia fria. Entretanto, o grupo IQ apresentou níveis de excesso de base significativamente menores que IFHI ( $p=0,0115$ ).



**Gráfico 11.** Níveis séricos de excesso de base 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. # $p<0,05$  comparado ao grupo IQ.

### 4.6.3. Sódio (Na<sup>+</sup>)

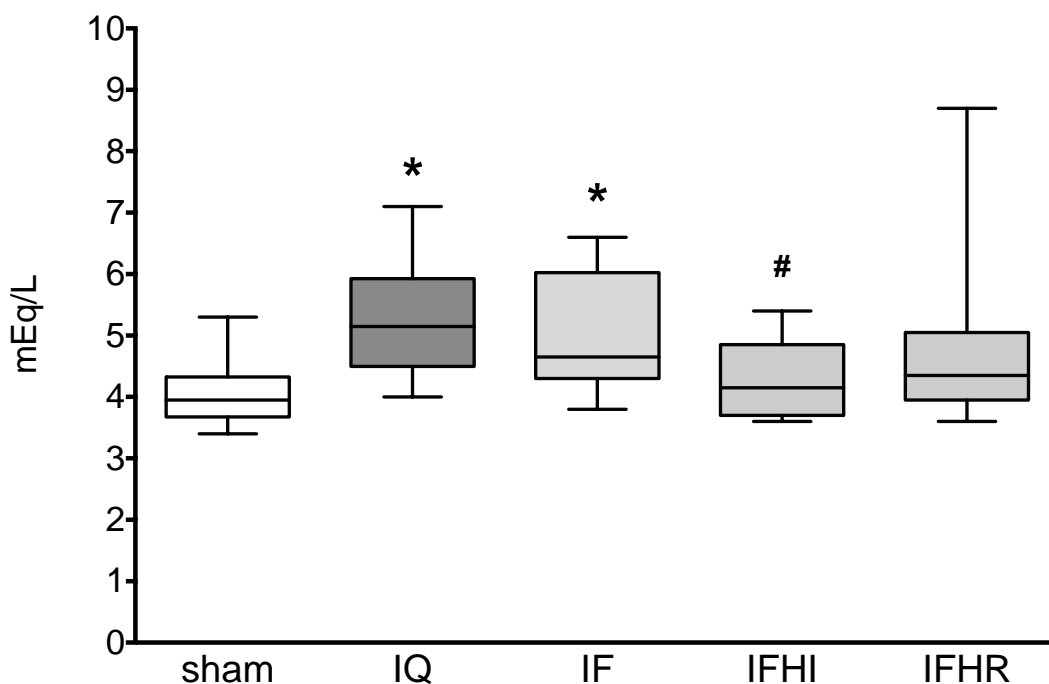
Não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa dos níveis de sódio sérico (Gráfico 12) entre o grupo sham ( $135 \pm 3,62$  mEq/L) e os demais grupos: IQ ( $134 \pm 3,55$  mEq/L), IF ( $134 \pm 3,77$  mEq/L), IFHI ( $138 \pm 2,62$  mEq/L), IFHR ( $137 \pm 1,55$  mEq/L); nem entre os grupos IQ e IF. Entretanto, os grupos IQ e IF apresentaram níveis de sódio significativamente menores que os grupos IFHI ( $p= 0,0189$  e  $0,0112$ , respectivamente) e IFHR ( $p=0,0242$  e  $0,0142$ , respectivamente).



**Gráfico 12.** Níveis séricos de sódio 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. # $p<0,05$  comparado ao grupo IQ, \$ $p<0,05$  comparado ao grupo IF.

#### 4.6.4. Potássio (K<sup>+</sup>)

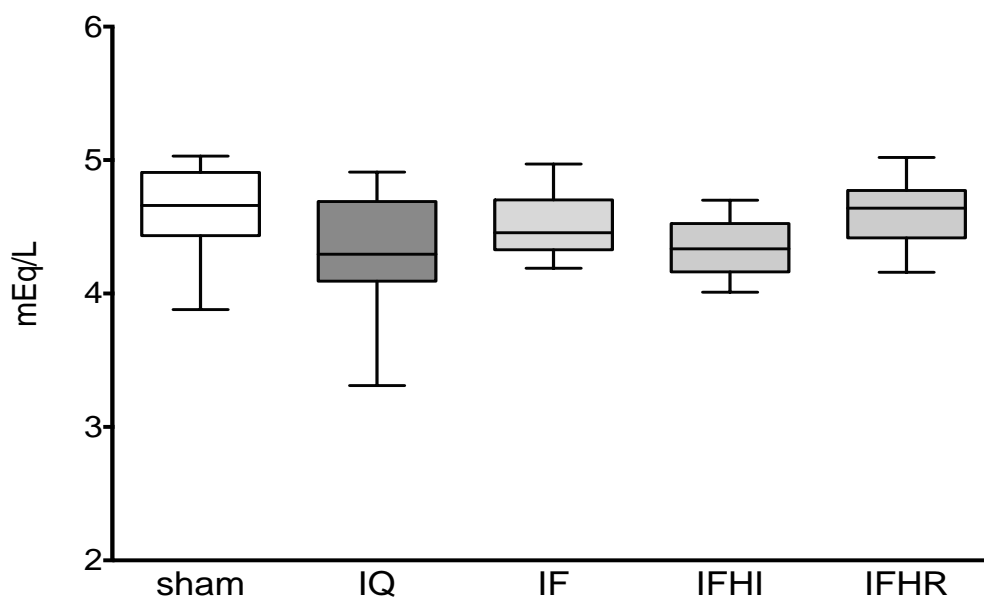
O nível sérico de potássio (Gráfico 13) do grupo sham ( $4,09 \pm 0,61$  mEq/L) foi significativamente menor em comparação ao grupo IQ ( $5,24 \pm 0,93$  mEq/L;  $p=0,0042$ ) e IF ( $4,95 \pm 0,99$  mEq/L;  $p=0,0306$ ). Além disso, os níveis de potássio do grupo IQ foram significativamente maiores que os do grupo IFHI ( $4,29 \pm 0,64$  mEq/L;  $p= 0,0158$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa entre o grupo sham e os grupos: IFHI e IFHR ( $4,80 \pm 1,47$  mEq/L); entre o grupo IQ e IF, ou entre os grupos submetidos a isquemia fria.



**Gráfico 13.** Níveis séricos de potássio 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes Reperfusão. N =10 por grupo.

#### 4.6.5. Cálcio iônico (iCa)

Não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa dos níveis de cálcio iônico arterial (Gráfico 14) entre o grupo sham ( $4,61 \pm 0,36$  mEq/L) e os demais grupos: IQ ( $4,32 \pm 0,47$ mEq/L), IF ( $4,52 \pm 0,25$ mEq/L), IFHI ( $4,35 \pm 0,22$ mEq/L), IFHR ( $4,60 \pm 0,27$ mEq/L); entre os grupos IQ e IF, ou entre os grupos submetidos a isquemia fria.

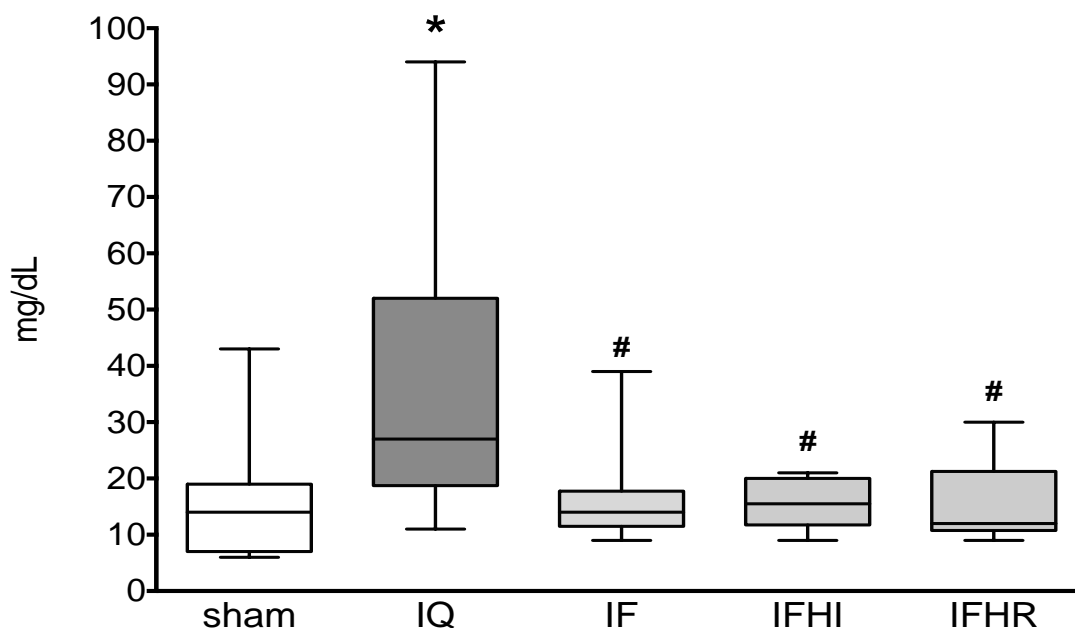


**Gráfico 14.** Níveis séricos de cálcio iônico 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N=10 por grupo. \* $p < 0,005$  comparado ao grupo sham. # $p < 0,05$  comparado ao grupo IQ.



#### 4.6.6. Lactato (Lac)

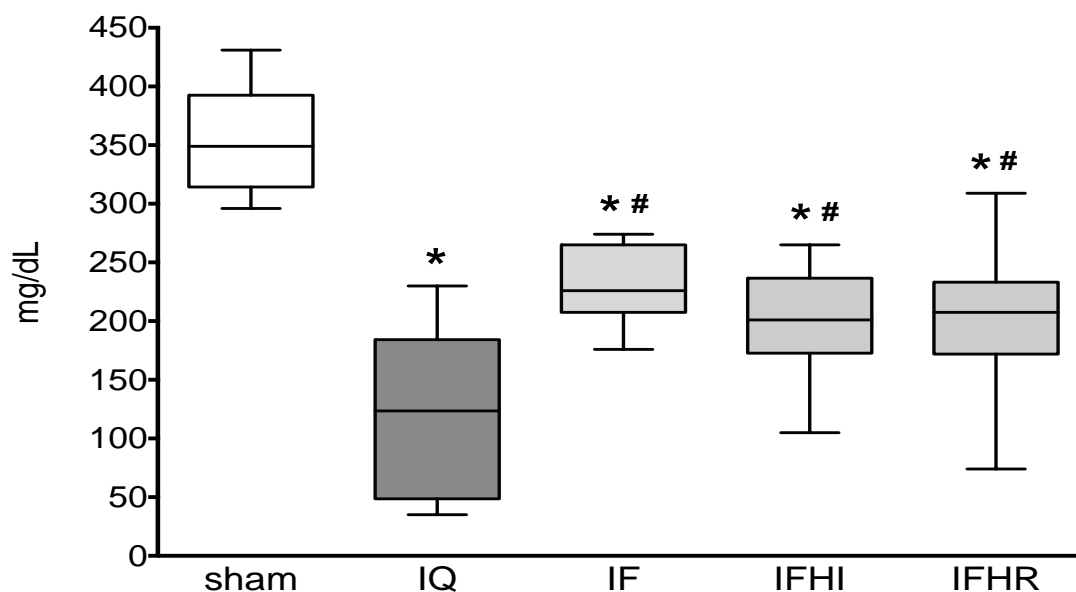
O nível de lactato arterial do grupo sham ( $15,2 \pm 10,9$  mg/dL) foi significativamente menor em comparação aos grupos IQ ( $36,0 \pm 25,0$  mg/dL;  $p=0,0042$ ) e IF ( $16,3 \pm 8,64$  mg/dL;  $p=0,0306$ ). Além disso o grupo IQ apresentou níveis de lactato significativamente maiores que os grupos IF ( $16 \pm 9$  mg/dl;  $p=0,011$ ), IFHI ( $15,5 \pm 4,09$  mg/dL;  $p=0,0199$ ), e IFHR ( $16,0 \pm 7,15$  mg/dL;  $p=0,0259$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa entre o grupo sham e os grupos IFHI e IFHR; e entre o grupo IQ e IF (Gráfico 15).



**Gráfico 15.** Níveis de lactato arterial 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \* $p<0,005$  comparado ao grupo sham, # $p<0,05$  comparado ao grupo IQ

#### 4.6.7. Glicose (Glu)

Os níveis séricos de glicose dos animais do grupo sham ( $354 \pm 45$  mg/dL) foram significativamente maiores em comparação aos níveis dos animais dos grupos submetidos a isquemia IQ ( $126 \pm 69$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ), IF ( $230 \pm 34$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ), IFHI ( $199 \pm 47$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ) e IFHR ( $202 \pm 62$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ). Adicionalmente o grupo IQ apresentou níveis de glicose significativamente menores que os grupos IF ( $p < 0,001$ ), IFHI ( $p = 0,0126$ ) e IFHR ( $p = 0,0183$ ). Não houve diferenças significativas nas comparações entre os grupos submetidos a isquemia fria (Gráfico 16).

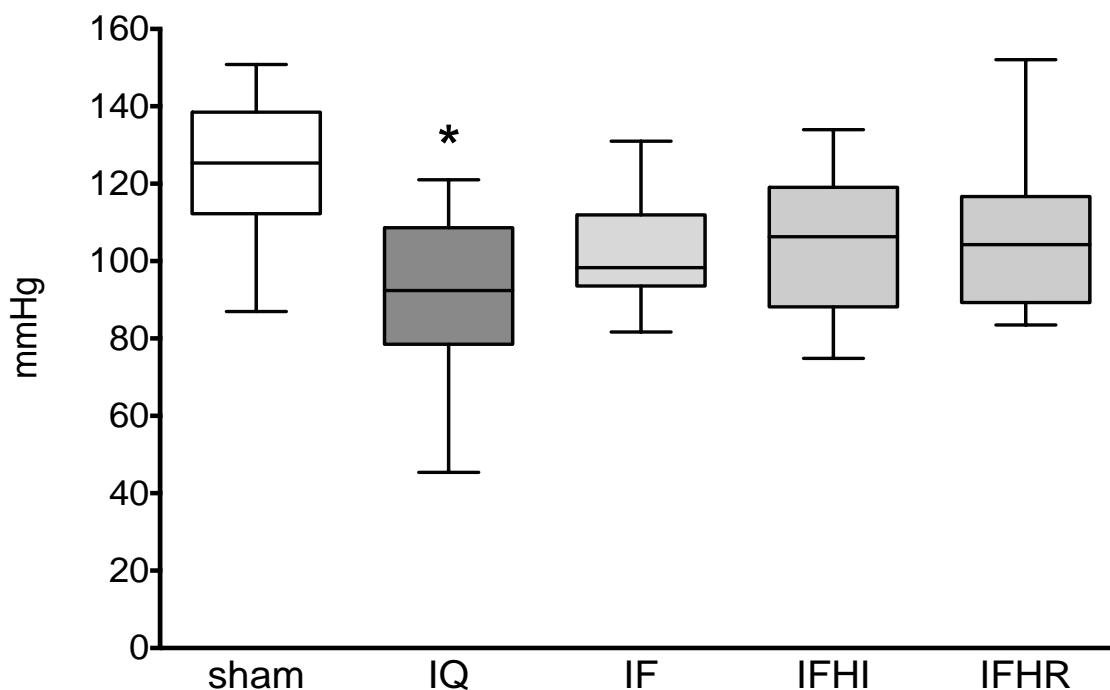


**Gráfico 16.** Níveis séricos de glicose 4h após a reperusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperusão N =10 por grupo. \* $p < 0,005$  comparado ao grupo sham.

## 4.7. Análise de parâmetro hemodinâmico

### 4.7.1. Pressão Arterial Média (PAM)

A PAM do grupo sham ( $124 \pm 19$  mmHg) foi significativamente maior em comparação ao grupo IQ ( $90 \pm 24$  mmHg;  $p=0,026$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na análise comparativa entre o grupo sham e os demais grupos: IF ( $102 \pm 15$  mmHg), IFHI ( $105 \pm 19$  mmHg), IFHR ( $106 \pm 20$  mmHg); entre o grupo IQ e IF, ou entre os grupos submetidos a isquemia fria (Gráfico 17).



**Gráfico 17.** Pressão arterial média 4h após a reperfusão. S, grupo sham; IQ, grupo isquemia quente; IF, grupo isquemia fria; IFHI, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da isquemia; IFHR, grupo isquemia fria tratado com NaCl 7,5% antes da Reperfusão. N =10 por grupo. \* $p<0,005$  comparado ao grupo sham.

## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de pesquisas e o estudo contínuo relacionados à isquemia/reperfusão de órgãos têm se mostrado um campo promissor e fecundo, visto que o transplante de órgãos tem se multiplicado em número e variedade, bem como as ressecções hepáticas têm sido cada vez mais amplas e extensas, mantendo margens limítrofes de 30% do parênquima remanescente. Nesse contexto, a inovação de tecnologias e métodos têm nos permitido melhor conhecer e compreender os processos bioquímicos e biofísicos que ocorrem durante os períodos de isquemia e reperfusão, os quais permanecem sendo muito significativos e determinantes para a sobrevivência do enxerto, do órgão remanescente e do próprio paciente e, estão relacionados diretamente com o tempo de isquemia/reperfusão(50, 71), com a extensão das ressecções(72) e os meios de preservação(73).

Este estudo avaliou o impacto da solução hipertônica NaCl 7,5% na redução da lesão de isquemia/reperfusão hepática em animais submetidos a hipotermia tópica do fígado. Os principais resultados incluem uma acentuada diminuição da necrose hepatocelular e do estresse oxidativo hepático, e normalização dos níveis de excesso de base e do potássio séricos associados a administração de NaCl 7,5%.

O presente estudo segue um modelo experimental, já bem estabelecido e desenvolvido no LIM-37, com base em estudos realizados anteriormente(33, 64), para pesquisa na linha de isquemia/reperfusão de órgãos e inflamação do fígado e pâncreas(66, 74). Ele utiliza ratos machos wistar com intervalo de

peso pré-determinado (230 a 300g). Neste modelo, produzimos a isquemia de 70% do órgão, através do clampeamento dos pedículos vasculares dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado, preservando o fluxo portal dos lobos direito (superior e inferior) e caudado, de modo a evitar a congestão esplâncnica e permitir a análise local e sistêmica dos efeitos resultantes exclusivamente do processo de I/R hepática(54).

A limitação deste estudo, deve-se ao curto período de isquemia quente tolerável pelos animais (menos de uma hora), visto que a isquemia quente de uma hora gera necrose hepatocelular grave, praticamente irreversível, inviabilizando uma análise por tempo superior a 40 minutos, promovendo morte dos animais antes do término do experimento, como pôde ser observado no período do estudo piloto.

O tempo de reperfusão foi determinado em quatro horas, pois estudos anteriores já evidenciaram que a fase inflamatória mais intensa, pós reperfusão, se estende por no máximo quatro a seis horas e é o período de maior atividade das células de K pffer e de produ o de espécies reativas de oxigênio secundária   disfun o mitocondrial(17, 56, 66, 75-78).

O uso da soluço salina hipertônica em sua concentra o, dose, via e velocidade de infusão, foi determinado com base no modelo previamente desenvolvido: 4ml/Kg IV lento, administrado durante 5 minutos através da veia peniana, visto não promover efeitos secundários   hipernatremia, produzindo apenas eleva o rápida e curta do nível sérico de sódio(66, 79). Assinalamos que neste estudo não foram identificadas diferenças significantes na análise comparativa das medidas do sódio entre os diferentes grupos de animais estudados, tratados ou não com SSH a 7,5%, corroborando as hipóteses de

estudos anteriores, de que a SSH a 7,5% utilizada na dose e modo sugeridas, não produz elevação do sódio sérico, nem efeitos secundários(62, 63).Na análise da literatura, verificamos que as soluções salinas hipertônicas a 7,5%, usadas em dose padrão de 4ml/kg de peso corporal, como fluidos de ressuscitação no paciente grave, apresentam propriedades antioxidantes e efeito protetor na microcirculação do fígado submetido a isquemia quente, o que também foi descrito em modelo de choque hemorrágico, tratado com administração de solução salina hipertônica-Dextran 6% (HSD)(65-67).

As transaminases ALT e AST, enzimas hepáticas utilizadas como marcadores de lesão hepática celular, presentes em níveis acima da normalidade na corrente sanguínea quando da presença de isquemia e ou alteração grave de permeabilidade da membrana celular, estão diretamente relacionadas ao grau e extensão da lesão hepatocelular. De modo que, os níveis dessas enzimas são amplamente utilizados em estudos e análises que envolvam avaliação do grau de lesão hepatocelular, ou como meio de validar ações hepatoprotetoras(80).

Neste estudo houve marcada redução dos níveis das transaminases AST (74,4%) e ALT (76,6%) nos animais submetidos à isquemia hipotérmica do fígado e tratados com SSH a 7,5%, comparados aos animais submetidos a isquemia normotérmica. Houve também diminuição do grau histológico da lesão de IR e de necrose hepatocelular comparável ao grupo sham e menor em relação ao grupo isquemia quente. Da análise comparativa do grau de necrose, destacamos que o grupo submetido a hipotermia e tratado com SSH a 7,5% antes da isquemia, apresentou resultado igual ao sham, com presença de apenas 30% de necrose leve, enquanto o grupo submetido somente a

hipotermia, sem tratamento com SSH, apresentou 30% de necrose moderada e 20% necrose leve, resultando em grau de necrose maior que o sham. Quanto ao grau de lesão histológica, o grupo IFHI apresentou níveis muito reduzidos, aproximados ao sham.

Em estudo similar realizado no LIM-37, Figueira ER et al(66) avaliaram os efeitos da SSH nas lesões resultantes da isquemia/reperfusão normotérmica. Estudo experimental em ratos evidenciou níveis de transaminases AST e ALT significativamente menores nos animais tratados com SSH, bem como necrose hepatocelular menos intensa, quando administrado no período pré-reperfusão, diferentemente de nossos achados, nos quais os menores níveis de transaminases e necrose hepatocelular foram obtidos no grupo tratado com SSH antes da isquemia, associado à hipotermia.

Os animais submetidos a isquemia fria e tratados com solução salina hipertônica a 7,5% apresentaram níveis reduzidos de IL-6, IL-10 e TNF-alfa em relação ao grupo submetido a isquemia normotérmica do fígado. Por sua vez, os animais submetidos a IQ apresentaram maiores níveis séricos arteriais de potássio e lactato e, menores níveis de glicose do que o grupo sham, acompanhado de maior hipotensão arterial. Conforme conhecimento prévio, a isquemia quente é muito mal tolerada pelos órgãos, ocorrendo mais lesão celular com perda de potássio do meio intracelular e elevação deste no meio extracelular, ativação das vias anaeróbicas de produção de energia e maior produção de lactato. A isquemia normotérmica quando estendida até uma hora ou mais, estabelece danos aos tecidos, considerados irreversíveis, dado o grau de necrose e de lesão histopatológica instalada (81, 82).

Em estudo analisando os efeitos da SSH sobre a expressão da enzima heme oxigenase-1(HO-1) na lesão secundária a IR hepática em ratos, Ke QH et al(33), obtiveram resultados similares à Attuwaybi B, et al(64). Ambos identificaram que os animais tratados com SSH previamente à isquemia, apresentavam aumento significativo de HO-1 e importante redução dos níveis séricos de ALT, TNF- $\alpha$ , bem como da atividade de MPO e ET-1. Constataram também, à análise histológica, apenas edema moderado dos hepatócitos e suave infiltração neutrofílica no fígado.

Do mesmo modo, em estudo analisando a habilidade da SSH como pré-tratamento na IR hepática, Ke QH et al(36) demonstraram a capacidade da SSH de diminuir os níveis de AST e ALT, inibir a liberação de TNF- $\alpha$ , diminuir o sequestro neutrofílico no fígado e a atividade da MPO, promovendo, por outro lado, significativo aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, em especial a IL-10, resultando em redução de lesão hepatocelular(36, 83). Consideraram também que os mesmos benefícios do uso da SSH, ou seja, o efeito anti-inflamatório e inibição de funções neutrofílicas, quando utilizado como fluido de ressuscitação no choque, no trauma e em infecção severa, foram encontrados e, observaram haver poucos estudos sobre o uso da SSH no tratamento das lesões secundárias a IR hepáticas, explorando sua ação no pré-tratamento. Citam ainda as duas fases características que ocorrem nas lesões hepáticas de IR: a inicial, que envolve ativação das células de Küpffer e produção de ERO, que produzem lesão hepatocelular; e a tardia, que é caracterizada por ativação ainda maior das células de Küpffer e citocinas inflamatórias com aumento exponencial da lesão hepatocelular.



Oreopoulos GD et al(83) realizaram estudo utilizando o pré condicionamento com SSH, para análise da prevenção de lesão secundária à IR hepática em ratos e, avaliaram o papel da interleucina-10 (IL-10). A SSH, quando utilizada em estados críticos como meio de ressuscitação, havia - em recentes estudos "in vivo"(37, 62) - demonstrado efeitos anti-inflamatórios, devido ao aumento da produção de IL-10. Já os estudos "in vitro" documentaram efeitos da SSH sobre muitos tipos de células, como neutrófilos, macrófagos e células endoteliais, com o mesmo efeito. Naqueles utilizando animais com deficiência de IL-10, foi sugerida que a habilidade da SSH no pré-tratamento em induzir a produção de IL-10 é central em seu efeito anti-inflamatório, como estratégia de pré-condicionamento. O achado principal nessa análise, foi que o uso da SSH reduziu a geração de TNF- $\alpha$  no fígado seguido de IR, através da indução da expressão de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10(83).

No estudo realizado por Yang et al(84), foi reportada a ação inibitória da IL-10 endógena sobre a produção de TNF- $\alpha$ , servindo como proteção das lesões secundárias à IR miocárdica e, quando a IL-10 foi administrada de forma exógena, também inibiu a lesão secundária à IR hepática. É conhecido que a IL-10 é regulada predominantemente pelos níveis de fatores de transcrição, assim como sp1, sp2 e STAT3 contribuem para sua transcrição, sendo o STAT3 o mais importante. Nesse estudo foi sugerido que o pré tratamento com SSH pode ativar STAT3, resultando na indução da liberação endógena de IL-10. Conclui assim que o pré tratamento com SSH antes da IR pode induzir uma marcada liberação da IL-10, que pode inibir o TNF- $\alpha$  e a infiltração neutrofílica dentro do fígado, reduzir os níveis de ALT e de atividade

da MPO, evitando lesão secundária à IR hepática, demonstrando que o uso da SSH é uma boa estratégia como prevenção da lesão de IR hepática(83, 84).

Avaliando a implicação da apoptose como um importante mecanismo contributivo para inflamação e lesão hepática após a IR, Reinehr et al(85), através do uso de SSH pré IR, identificaram aumento expressivo da atividade da caspase 3, sugerindo que a hiperosmolaridade sensibiliza hepatócitos por indução de apoptose através de CD95 ligand. Embora a SSH induza ao prejuízo na translocação de NF- $\kappa$ B, removendo o maior sinal anti-apoptótico no fígado, considerados conjuntamente, parece improvável que o efeito protetor do pré-tratamento com SSH seja devido apenas à inibição da apoptose hepatocítica.

O evento de má perfusão e hipóxia tecidual, gerando isquemia/reperfusão hepática, resulta em imediata ativação de neutrófilos e células de kúpffer, adesão destes ao endotélio promovendo lesão microvascular, estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e a IL-1. Por sua vez, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 ativam a síntese de IL-8 e de moléculas de adesão (selectinas e integrinas). Estas moléculas de adesão promovem maior interação entre neutrófilos e células endoteliais e produção ainda maior de citocinas. O TNF- $\alpha$  é considerado a mais importante citocina, devido ao seu papel quimiotáxico, ativador de neutrófilos, e por estimular as células de kúpffer a produzir ERO e mais TNF- $\alpha$ (86, 87).

As células de Kúpffer, além de sua função fagocítica, estimulam a produção de vários outros agentes inflamatórios - como a interleucina 6, o interferon gama, o óxido nítrico, o fator ativador de plaquetas, além dos já citados, TNF- $\alpha$  e IL-1 - desencadeando uma cascata inflamatória que pode

conduzir a lesão hepatocítica grave com dano celular irreversível(16, 86, 87). A produção de tais fatores tem relação direta com a extensão da lesão inflamatória decorrente da isquemia/reperfusão hepática, de modo a justificar a determinação dos níveis das citocinas produzidas, como meio de inferir a gravidade da lesão.

Simultaneamente, elementos protetores também são ativados, incluindo a HO-1 (heme oxigenase endógena) e a IL-10, que têm importância na reversibilidade do processo de lesão secundária à IR. A IL-10 é uma molécula com potente ação anti-inflamatória, anti-apoptótica, anti-oxidante e mantenedora da microcirculação, considerada até o momento como o mais importante fator no mecanismo citoprotetor, dentro do processo que envolve a lesão de IR hepática(36).

A hipóxia decorrente da interrupção do fluxo sanguíneo ao órgão e presente no período de estocagem em meio de preservação, gera alteração do metabolismo de energia e das funções enzimáticas celulares, comprometendo a disponibilidade de ATP para os processos bioquímicos, afetando diretamente os sistemas energia dependentes, como por exemplo, a importante função da bomba de troca  $\text{Na}^2+\text{K}+\text{ATPase}$ , resultando em acúmulo intracelular de sódio e subsequente edema, assim como aumento da concentração intracelular de cálcio. A isquemia e anóxia resultantes promovem acúmulo da enzima xantina-oxidase no citosol, gerando alteração temporária da permeabilidade dos canais da membrana mitocondrial, causando fosforilação oxidativa, produção de espécies reativas de oxigênio e redução dos níveis de ATP mitocondrial. Dentre as principais ERO produzidas, destacamos o radical superóxido, o hidroxil e o peróxido de hidrogênio, que por sua vez, lesam diretamente

lipídeos, proteínas, enzimas, membranas celulares, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e mesmo, o citoesqueleto, promovendo lesão tecidual(16).

Neste estudo, a análise do estresse oxidativo, através de produtos da peroxidação lipídica do tecido hepático, pela determinação da concentração do malonaldeído (MDA), mostrou que as mais baixas concentrações encontradas ocorreram no grupo submetido à hipotermia do fígado tratado com SSH a 7,5% antes da isquemia, comparado ao grupo submetido apenas à hipotermia. Por sua vez, o grupo IQ, apresentou as mais altas concentrações de MDA do estudo, comparado aos demais grupos de animais avaliados. Esse resultado, obtido através da análise indireta da ocorrência de peroxidação lipídica, sugere que o tratamento com SSH a 7,5% associado a hipotermia, quando utilizado no período pré-isquemia, promove redução na produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, menos morte celular e lesão histopatológica secundária à IR hepática. Pôde ser observado, também, que as mais altas taxas de MDA, portanto de estresse oxidativo, ocorreram no grupo submetido à isquemia normotérmica, corroborando dados de literatura(7).

Importante salientar que as baixas concentrações de oxigênio e NADPH presentes no período de isquemia levam à diminuição da produção de óxido nítrico, e que na reperfusão, observa-se níveis altos de produção de NO, de forma limitada e rápida, devido ao influxo de íons cálcio nas células e estímulo da ação da enzima óxido nítrico sintetase (eNOS). Tal aumento pode ser lesivo porque o NO reage com o superóxido e produz peroxinitrito que é um oxidante altamente tóxico. No período de reperfusão ocorre aumento da resistência vascular, redução do fluxo e da viscosidade sanguínea, com subsequente deformação dos eritrócitos e destruição dos mesmos por radicais livres de

oxigênio, aumentando a disponibilidade de seus produtos de degradação, como por exemplo, o MDA(88).

A hipotermia como meio de preservação de órgãos sólidos é algo já bem estabelecido e amplamente usado, porém, permanecem desconhecidos ou incertos os exatos mecanismos através dos quais isto ocorre (39, 40). O que tem sido proposto é que a hipotermia promova redução do metabolismo celular e, com isto, redução do requerimento de oxigênio para suas funções, de modo a evitar o início do metabolismo anaeróbico e produção de espécies reativas de oxigênio, bem como reduza a ativação de neutrófilos. Deste modo, toda a cascata inflamatória que produz a lesão secundária à IR hepática fica impedida, temporariamente, de ocorrer (26, 41, 53, 89).

Attuwaybi B, et al(64) em um estudo analisando o uso da SSH a 7,5% comparado ao uso da solução RL na IR mesentérica, demonstrou redução da inflamação do intestino, da lesão da mucosa e da lentificação do trânsito, através da indução da produção da enzima heme-oxigenase 1(HO-1), que estava associada com a redução da atividade de MPO (indício da presença de PMN), da lesão de mucosa, e do trânsito intestinal. A HO-1 tem demonstrado ação protetora nas situações de isquemia/reperfusão, apresentando ação contra o stress oxidativo em vários tecidos como coração, pulmão, fígado e rins, responsável por um dos mais importantes sistemas citoprotetores na IR hepática(90-93). A HO-1 é capaz de eliminar os metabólitos da reação oxidativa: catalisa e limita as taxas de degradação do heme, produzindo quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono(CO) e ferro livre, os quais têm importante papel na citoproteção(65, 94). A bilirrubina é um conhecido antioxidante e promove proteção contra lesão por radicais livres; o

CO por meio da ativação da guanylciclase e consequente formação de monofosfato de guanosinaciclase causa vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, e é um importante modulador da resposta inflamatória; a ferritina induzida pela HO-1 promove citoproteção através do sequestro do ferro livre e consequente redução do estado pró-oxidante celular(91).

Na análise das medidas de mieloperoxidase pulmonar (MPO), com vistas a determinar o efeito sobre a redução do recrutamento de neutrófilos no fígado e em órgãos à distância, observou-se que o grupo submetido a hipotermia do fígado, tratado com solução salina hipertônica a 7,5% antes da isquemia, apresentou níveis de MPO significativamente reduzidos em relação ao grupo que foi submetido apenas a hipotermia, reduzindo a infiltração de PMN a nível pulmonar devido a IR hepática, conforme visto em outros estudos(53) e anteriormente demonstrado em estudo realizado no LIM-37 da FMUSP(66). Salientamos que o pico de elevação de MPO ocorre mais tardiamente, cerca de 8 a 12 horas após o início da reperfusão, sendo que neste estudo a coleta de material para análise ocorreu 4 horas após a IR hepática, tempo já suficiente para demonstrar o benefício do tratamento com solução salina hipertônica a 7,5%, administrado antes da isquemia e associado à hipotermia, na redução da resposta inflamatória local e sistêmica, produzida pela IR hepática.

Na análise bioquímica do bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) e excesso de bases (SBE), destacamos que o grupo IQ apresentou os níveis mais baixos de bicarbonato e excesso de bases comparado aos demais grupos do estudo, evidenciando deste modo que a isquemia normotérmica do fígado é muito mal tolerada, com elevada produção de ácidos (ERO), gerando consumo de

bicarbonato e bases para promover tamponamento iônico. Quanto ao sódio, os grupos tratados com solução salina hipertônica a 7,5% apresentaram níveis significativamente maiores que os grupos não tratados, porém mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade, comprovando deste modo que a SSH utilizada na dose recomendada no modelo deste estudo, promove elevações curtas e rápidas dos níveis de sódio, não causando elevações acima da normalidade, nem efeitos deletérios. Os níveis de potássio do grupo IQ foram significativamente maiores que os do grupo IFHI, provavelmente devido à maior lesão celular presente na isquemia, sugerindo efeito protetor adicional da SSH a 7,5% para a hipotermia (82). Em relação ao cálcio iônico, não foram observadas diferenças na análise entre os grupos de animais do estudo. Quanto ao lactato, destacamos que o grupo IQ apresentou níveis significativamente maiores que os grupos submetidos a hipotermia hepática e tratados com solução salina hipertônica a 7,5%, seja antes da isquemia ou antes da reperfusão, permitindo observar que o tratamento com SSH agregado a hipotermia nestes grupos promoveu redução da lactatemia, por provável ação hemodinâmica, com restabelecimento da perfusão e do fluxo sanguíneo, aumento do aporte e liberação de O<sub>2</sub> aos tecidos, redução da hipóxia tecidual, da produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas inflamatórias, desencadeadas pelo processo de IR hepática. Quanto à glicose, assinalamos que o grupo IQ apresentou níveis significativamente reduzidos em relação aos demais grupos de animais do estudo, que se justificam pelo elevado grau de consumo de glicose para produção de energia via metabolismo anaeróbico, naqueles submetidos a isquemia normotérmica do fígado.

Em estudos comparativos entre a Solução Salina Hipertônica a 7,5% (SSH) e o uso de Ringer lactato ou Soro Fisiológico 0,9%, foi demonstrado seu potencial e superior efeito benéfico hemodinâmico e anti-inflamatório, em situações que envolvem alterações do fluxo sanguíneo à nível sistêmico ou local, com restabelecimento do volume circulatório, do débito cardíaco, da pressão arterial média, com conseqüente redução do dano celular secundário ao hipofluxo. Sua ação osmótica, reduz edema celular e intersticial, promovendo, num segundo momento, uma melhora circulatória generalizada, permitindo uma otimização na entrega de O<sub>2</sub> e carregando os produtos ácidos resultantes do metabolismo. Deste modo, a liberação de agentes pró-inflamatórios responsáveis pela cadeia oxidativa, que resulta em morte celular e falência múltipla de órgãos, é reduzida (62, 63, 67, 95)

O estudo realizado por Coimbra R et al(62) sugeriu uma potencial propriedade imuno moduladora da SSH, quando comparada ao uso de RL, devido à restauração da supressão de células T, melhora do padrão perfusional, hemodinâmico e microcirculatório; reduzir edema celular pulmonar; diminuir o período isquêmico; produzir menor lesão dos órgãos(fígado e pulmão)(95); e reduzir mortalidade após choque hemorrágico em ratos seguido de sepses(21, 63, 67). Menciona ainda, que o mecanismo através do qual a SSH teria uma função de melhorar a resposta imune celular era, até então, desconhecido.

Em estudo desenvolvido por Vollmar, B. et al(21), foi mencionado que uma das características das células dos mamíferos é a não tolerância a variações nos gradientes de pressão hidrostática, e que alterações entre a osmolaridade do meio intra e extra-celulares são seguidas de movimentação



de água através de sua membrana, com modificação do volume celular(62). A não manutenção dos gradientes de pressão hidrostática constantes desencadeia uma série de eventos sinalizadores intracelulares, com a mudança no potencial elétrico das membranas celulares e no balanço iônico intracelular, estimula mensageiros secundários, a expressão gênica e a fosforilação de diversas proteínas(17, 35).

A cascata de ativação mitogênica da proteína quinase foi identificada como um caminho sinalizador que traduz a resposta ao stress osmolar(66, 96). A adenosina trifosfato guanosina (ATG) é ativada através do stress osmótico e pode induzir a remodelação do citoesqueleto cortical nas células epiteliais, com adaptações moleculares compensatórias podendo levar à morte celular programada; por outro lado as células epiteliais também são suscetíveis a hipertonicidade, como documentado em Powers, K. et al(97),que utilizou um modelo de choque hemorrágico, em que a ressuscitação com SSH reduziu a apoptose no intestino delgado.

A SSH tem significância documentada e grande importância na regulação do volume celular, na função dos eritrócitos, na transferência epitelial, na regulação do metabolismo, na liberação de hormônios, e na contração, migração e proliferação celular. Pesquisadores têm mostrado que a ressuscitação com SSH tem profundos efeitos na tradução de sinais precoces que regulam a expressão gênica do stress em neutrófilos, células endoteliais, macrófagos alveolares, e células epiteliais intestinais(79, 98).

Com base em publicações anteriores, buscamos no presente estudo examinar os benefícios do uso da solução salina hipertônica a 7,5% associada à hipotermia, com vistas a identificarmos provável ação somatória destas duas

intervenções, no período pré- isquemia e pré-reperusão. Com base na análise dos resultados se identificaria o momento mais indicado para a utilização do tratamento com SSH, com vistas a obtermos a menor extensão possível de lesão secundária à ação inflamatória da IR hepática. Neste estudo, as evidências sinalizam para a ação benéfica da hipotermia, haja vista a marcada diminuição dos níveis de transaminases AST e ALT, do grau histológico da lesão de IR, de necrose hepatocelular, e níveis diminuídos de IL-6 e IL-10, nos animais submetidos a hipotermia do fígado comparável ao grupo sham, e TNF-alfa reduzido em comparação aos animais submetidos a IQ. Destacamos que o grupo IFHI apresentou grau de necrose muito baixo, comparável ao sham, e média do grau de lesão histológica menor que o sham, sugerindo fortemente que a SSH a 7,5% associada à hipotermia, quando utilizada no período pré-isquemia pode apresentar ação benéfica, reduzindo a lesão secundária à isquemia/reperusão hepática.

Considerando que este estudo buscou avaliar os efeitos do uso da solução salina hipertônica a 7,5% associada ao uso da hipotermia e, dado os benefícios identificados na redução de lesão histopatológica do fígado, secundária ao processo de isquemia/reperusão hepática, seria recomendável que mais estudos fossem realizados no intuito de podermos num futuro próximo, utilizar a SSH em humanos, submetidos a procedimentos cirúrgicos onde a IR esteja presente.

## 6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo, podemos afirmar que nos animais submetidos a isquemia/reperfusão hepática:

A associação da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) à hipotermia regional do fígado em ratos reduz a lesão hepatocelular, o estresse oxidativo e os distúrbios iônicos secundários à isquemia/reperfusão, em especial quando utilizada no período pré-isquemia.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Margarido NF. [Functional and histological aspects of the liver after ischemia. Experimental study in dogs]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1973;28(4):203-11.
2. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg*. 1908;48(4):541-9.
3. Bystrom P, Foley N, Toledo-Pereyra L, Quesnelle K. Ischemic preconditioning modulates ROS to confer protection in liver ischemia and reperfusion. *Excli Journal*. 2017;16:483-96.
4. Man K, Fan ST, Ng IOL, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Annals of Surgery*. 1997;226(6):704-11.
5. Moussa ME, Isla AM, Sarraf CE, Uemoto S, Sawada H, Habib NA. Effect of total vascular exclusion during liver resection on hepatic ultrastructure. *Cavallari A, Mazziotti A, Principe A, editors*1996. 405-9 p.
6. Badia JM, Ayton CL, Evans TJ, Carpenter AJ, Nawfal G, Kinderman H, et al. Systemic cytokine response to hepatic resections under total vascular exclusion. *European Journal of Surgery*. 1998;164(3):185-90.
7. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia reperfusion injury of the liver. *Chemico-Biological Interactions*. 1991;79(2):115-36.
8. Al-Freah MAB, McPhail MJW, Dionigi E, Foxtan MR, Auzinger G, Rela M, et al. Improving the Diagnostic Criteria for Primary Liver Graft Nonfunction in Adults Utilizing Standard and Transportable Laboratory Parameters: An Outcome-Based Analysis. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(5):1255-66.
9. Chen XB, Xu MQ. Primary graft dysfunction after liver transplantation. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2014;13(2):125-37.
10. Neves DB, Rusi MB, Diaz LGG, Salvalaggio P. Primary graft dysfunction of the liver: definitions, diagnostic criteria and risk factors. *Einstein-Sao Paulo*. 2016;14(4):567-72.

11. Quesnelle KM, Bystrom PV, Toledo-Pereyra LH. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Archives of Toxicology*. 2015;89(5):651-7.
12. Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Catafau JR, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(9):1200-8.
13. Kanel GC, Korula J. Morphologic landmarks in liver pathology. In: GC K, J K, editors. *Liver biopsy evaluation: histologic diagnosis and clinical correlation*. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 102-20.
14. Klune JR, Tsung A. Molecular Biology of Liver Ischemia/Reperfusion Injury: Established Mechanisms and Recent Advancements. *Surgical Clinics of North America*. 2010;90(4):665-+.
15. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997;61(6):647-53.
16. Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski J, Busuttil RW. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplantation Reviews*. 2000;14(2):106-26.
17. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Current Molecular Medicine*. 2003;3(6):527-35.
18. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2002;105(2):248-58.
19. Bailey SM, Reinke LA. Effect of low flow ischemia-reperfusion injury on liver function. *Life Sciences*. 2000;66(11):1033-44.
20. Elias-Miro M, Jimenez-Castro MB, Rodes J, Peralta C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radical Research*. 2013;47(8):555-68.
21. Vollmar B, Menger MD. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiological Reviews*. 2009;89(4):1269-339.

22. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR, Jr. Rat liver postischemic lipid peroxidation and vasoconstriction depend on ischemia time. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(3):255-64.
23. Aii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2003;10(3):189-94.
24. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium-ions and calcium-channel entry blockers in experimental-ischemia reperfusion-ischemia reperfusion-induced liver-injury. *Annals of Surgery.* 1991;213(2):137-42.
25. Pan LJ, Zhang ZC, Zhang ZY, Wang WJ, Xu Y, Zhang ZM. Effects and mechanisms of store-operated calcium channel blockade on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World Journal of Gastroenterology.* 2012;18(4):356-67.
26. de Azua-Lopez ZR, Naranjo-Izurieta JR, Lameirao J, Martin-Villen L, Porrás-Lopez M, Palomo-Lopez N, et al. Cold Ischemia Time as a Factor in Post-transplantation Complications for Orthotopic Hepatic Transplantation. *Transplantation Proceedings.* 2018;50(2):637-9.
27. Martins RM, Teodoro JS, Furtado E, Rolo AP, Palmeira CM, Tralhao JG. Recent insights into mitochondrial targeting strategies in liver transplantation. *International Journal of Medical Sciences.* 2018;15(3):248-56.
28. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2003;18(8):891-902.
29. Marti R. Xanthine oxidoreductase and preservation injury in human liver transplantation (vol 77, pg 1239, 2004). *Transplantation.* 2004;77(12):1920-.
30. Pesonen EJ, Linder N, Raivio KO, Sarnesto A, Lapatto R, Hockerstedt K, et al. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology.* 1998;114(5):1009-15.
31. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. *Hepatology.* 1997;25(2):356-60.

32. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011;26:180-7.
33. Ke QH, Zheng SS, Liang TB, Xie HY, Xia WL. [Effects of hypertonic saline on expression of heme oxygenase enzyme-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury rats]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2006;18(1):5-8.
34. Yamakawa Y, Takano M, Patel M, Tien N, Takada T, Bulkley GB. Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. *Annals of Surgery*. 2000;231(3):387-98.
35. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Surgery*. 2001;181(2):160-6.
36. Ke QH, Zheng SS, Liang TB, Xie HY, Xia WL. Pretreatment of hypertonic saline can increase endogenous interleukin 10 release to attenuate hepatic ischemia reperfusion injury. *Dig Dis Sci*. 2006;51(12):2257-63.
37. Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplantation Proceedings*. 2002;34(7):2659-61.
38. Littauer A, Degroot H. Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation - 3 phases and role of mitochondria. *American Journal of Physiology*. 1992;262(6):G1015-G20.
39. Yamanaka N, Dal CL, Okamoto E. Historical evolution of hypothermic liver surgery. *World Journal of Surgery*. 1998;22(10):1104-7.
40. Raffucci FL, Lewis FJ, Wangenstein OH. Hypothermia in experimental hepatic surgery. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1953;83(3):639-40.
41. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver International*. 2006;26(6):734-41.
42. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold-storage. *Transplantation*. 1988;45(4):673-6.

43. Hesse UJ, Troisi R, Jacobs B, Maene L. Preservation of the porcine pancreas with HTK solution. *Langenbecks Archives of Surgery*. 1999;609-13.
44. Martins P, Berendsen T, Yeh H, Bruinsma B, Izamis M, Uygun K, et al. Perfluorocarbon Added to the University of Winsconsin Solution Reduces Ischemia Reperfusion Injury and Prolongs Survival of DCD Liver Grafts. *American Journal of Transplantation*. 2013;13:490-.
45. Duval M, Plin C, Elimadi A, Vallerand D, Tillernent JP, Morin D, et al. Implication of mitochondrial dysfunction and cell death in cold preservation - warm reperfusion-induced hepatocyte injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006;84(5):547-54.
46. Lee LY, Kaizu T, Toyokawa H, Zhang M, Ross M, Stolz DB, et al. Carbon monoxide induces hypothermia tolerance in Kupffer cells and attenuates liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Transpl*. 2011;17(12):1457-66.
47. Yewei X, Liya D, Jinghao Z, Rufang Z, Li S. Study of the mechanism of pulmonary protection strategy on pulmonary injury with deep hypothermia low flow. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2013;17(7):879-85.
48. Stegemann J, Hirner A, Rauen U, Minor T. Gaseous oxygen persufflation or oxygenated machine perfusion with Custodiol-N for long-term preservation of ischemic rat livers? *Cryobiology*. 2009;58(1):45-51.
49. Minor T, Efferz P, Luer B. Hypothermic reconditioning by gaseous oxygen persufflation after cold storage of porcine kidneys. *Cryobiology*. 2012;65(1):41-4.
50. Minor T, Paul A. Hypothermic reconditioning in organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2013;18(2):161-7.
51. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *Journal of the American College of Surgeons*. 2000;191(6):650-6.
52. Gabiatti G, Grezzana TDM, Cerski CTS, Bofill C, Valle S, Corse CO. Topical hepatic hypothermia associated with ischemic preconditioning. Histopathological and biochemical analysis of ischemia reperfusion damage in a 24 hour model. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2018;33(10):924-34.



53. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002;282(4):G608-G16.
54. Li R, Mi YT, Tan G, Zhang W, Li GX, Sun XY. A novel in situ model of liver cold ischemia-reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research*. 2014;192(1):195-9.
55. Peglow S, Toledo AH, Anaya-Prado R, Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH. Allopurinol and xanthine oxidase inhibition in liver ischemia reperfusion. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2011;18(2):137-46.
56. Zahrebelski G, Nieminen AL, Alghoul K, Qian T, Herman B, Lemasters JJ. Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes - a laser-scanning confocal microscopic study. *Hepatology*. 1995;21(5):1361-72.
57. Nogueira MA, Coelho AMM, Sampietre SN, Molan NA, Patzina RA, D'Albuquerque LC, et al. Beneficial Effects of Diazoxide on Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Gastroenterology*. 2013;144(5):S1112-S.
58. Ni M, Fu H, Huang F, Zhao T, Chen JK, Li DJ, et al. Vagus Nerve Attenuates Hepatocyte Apoptosis upon Ischemia-Reperfusion via alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor on Kupffer Cells in Mice. *Anesthesiology*. 2016;125(5):1005-16.
59. Rocha-Santos V, Figueira ER, Rocha-Filho JA, Coelho AM, Pinheiro RS, Bacchella T, et al. Pentoxifylline enhances the protective effects of hypertonic saline solution on liver ischemia reperfusion injury through inhibition of oxidative stress. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14(2):194-200.
60. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, RoselloCatafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: Role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997;25(4):934-7.
61. Figueira ERR, Rocha JA, Lanchotte C, Coelho AMM, Nakatani M, Tatebe ER, et al. Sevoflurane Preconditioning plus Postconditioning Decreases Inflammatory Response with Hemodynamic Recovery in Experimental Liver Ischemia Reperfusion. *Gastroenterology Research and Practice*. 2019:7.
62. Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, et al. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 1997;42(4):602-7.

63. Coimbra R, Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Evers MF. Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing prostaglandin E(2) and interleukin-4 production. *Journal of Surgical Research*. 1996;64(2):203-9.
64. Attuwaybi B, Kozar RA, Gates KS, Moore-Olufemi S, Sato N, Weisbrodt NW, et al. Hypertonic saline prevents inflammation, injury, and impaired intestinal transit after gut ischemia/reperfusion by inducing heme oxygenase 1 enzyme. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 2004;56(4):749-58.
65. Corso CO, Okamoto S, Ruttinger D, Messmer K. Hypertonic saline dextran attenuates leukocyte accumulation in the liver after hemorrhagic: Shock and resuscitation. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 1999;46(3):417-23.
66. Figueira ER, Bacchella T, Coelho AM, Sampietre SN, Molan NA, Leitao RM, et al. Timing-dependent protection of hypertonic saline solution administration in experimental liver ischemia/reperfusion injury. *Surgery*. 2010;147(3):415-23.
67. Coimbra R, Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Hypertonic/hyperoncotic fluids reverse prostaglandin E(2) (PGE(2))-induced T-cell suppression. *Shock*. 1995;4(1):45-9.
68. Frey L, Kesel K, Pruckner S, Pacheco A, Welte M, Messmer K. Is sodium-acetate dextran superior to sodium-chloride dextran for small-volume resuscitation from traumatic hemorrhagic-shock. *Anesthesia and Analgesia*. 1994;79(3):517-24.
69. Rocha Filho JA, Machado MAC, Nani RS, Rocha JPS, Figueira ERR, Bacchella T, et al. Hypertonic saline solution increases cerebral perfusion pressure during clinical orthotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure: preliminary results. *Clinics*. 2006;61(3):231-8.
70. Abdo EE, Figueira ERR, Rocha-Filho JA, Chaib E, D'Albuquerque LAC, Bacchella T. Preliminary results of topical hepatic hypothermia in a model of liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Arq Gastroenterol*. 2017;54(3):246-9.
71. Quireze C, Montero EFD, Leitao RMC, Juliano Y, Fagundes DJ, Poli-de-Figueiredo LF. Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Investigative Surgery*. 2006;19(4):229-36.

72. Pokorny H, Langer F, Herkner H, Schernberger R, Plochl W, Soliman T, et al. Influence of cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clinical Transplantation*. 2005;19(4):532-6.
73. Moore DE, Feurer ID, Speroff T, Gorden DL, Wright JK, Chari RS, et al. Impact of donor, technical, and recipient risk factors on survival and quality of life after liver transplantation. *Archives of Surgery*. 2005;140(3):273-7.
74. Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Morino M, Astarcioglu I, et al. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver-transplantation. *Lancet*. 1992;340(8832):1373-6.
75. Machado MCC, Coelho AMM, Pontieri V, Sampietre SN, Molan NAT, Soriano F, et al. Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006;32(1):80-6.
76. Roe M, Lemasters J, Herman B. An assessment of the use of FURA-2 for the determination of intracellular calcium-concentration. *Federation Proceedings*. 1987;46(6):2277-.
77. Brenner DA, Hatano E, Bradham C, Schwabe R, Jimuro YJ, Qian T, et al. Regulation of TNF-alpha- and Fas-induced hepatic apoptosis by NF-kappa B. *Okita K, editor*2002. 27-32 p.
78. Apel E, Lemasters J, Thurman R. Mechanism of increased sensitivity of perfused livers from ethanol-treated rats to hypoxia. *Faseb Journal*. 1988;2(5):A1426-A.
79. Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline infusion for pulmonary injury due to ischemia-reperfusion. *Arch Surg*. 2003;138(1):9-14.
80. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics*. 2005;60(2):159-72.
81. Hall JE. *Energética celular e o metabolismo basal*. Guyton & Hall : tratado de fisiologia médica: Elsevier; 2011. p. 905-12.
82. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2000;32(2):169-73.

83. Rocha JA, Nani RS, D'Albuquerque LAC, Malbouisson LMS, Carmona MJC, Rocha-E-Silva M, et al. Potassium in Hemorrhagic Shock: A Potential Marker of Tissue Hypoxia. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*. 2010;68(6):1335-41.
84. Oreopoulos GD, Wu HS, Szaszi K, Fan J, Marshall JC, Khadaroo RG, et al. Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: A role for interleukin 10. *Hepatology*. 2004;40(1):211-20.
85. Yang ZQ, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2000;101(9):1019-26.
86. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Haussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology*. 2002;36(3):602-14.
87. Castro e Silva Jr Od, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2002;17:96-100.
88. Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2004;19:1-12.
89. Xie G, Kanel GC, DeLeve LD. Regulation of liver sinusoidal endothelial cell (SEC) phenotype and therapeutic implication. *Journal of Investigative Medicine*. 2010;58(1):170-.
90. Alva N, Carbonell T, Palomeque J. Hypothermic protection in an acute hypoxia model in rats: Acid-base and oxidant/antioxidant profiles. *Resuscitation*. 2010;81(5):609-16.
91. Richards JA, Wigmore SJ, Devey LR. Heme oxygenase system in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(48):6068-78.
92. Liu B, Qian JM. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(11):19867-73.
93. Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;279(6):L1029-L37.

94. Ke BB, Shen XD, Ji HF, Kamo N, Gao F, Freitas MCS, et al. HO-1-STAT3 axis in mouse liver ischemia/reperfusion injury: Regulation of TLR4 innate responses through PI3K/PTEN signaling. *Journal of Hepatology*. 2012;56(2):359-66.
95. Liao YF, Zhu W, Li DP, Zhu X. Heme oxygenase-1 and gut ischemia/reperfusion injury: A short review. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19(23):3555-61.
96. Monteiro Pacheco A, Jr., Martins Coimbra RS, Kreimeier U, Frey L, Messmer K. Hypertonic volume therapy: feasibility in the prevention and treatment of multiple organ failure and sepsis. *Sao Paulo Med J*. 1995;113(6):1053-60.
97. Junger WG, Hoyt DB, Davis RE, Herdon-Remelius C, Namiki S, Junger H, et al. Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant receptor signaling and activating mitogen-activated protein kinase p38. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(12):2768-79.
98. Powers KA, Zurawska J, Szaszi K, Khadaroo RG, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/reperfusion. *Surgery*. 2005;137(1):66-74.
99. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *Journal of Immunology*. 1998;161(11):6288-96.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1. Identificação dos ratos (R) por grupos:

SHAM	IQ	IF	IFHI	IFHR
R4	R1	R14	R49	R3
R5	R9	R15	R50	R6
R12	R13	R18	R51	R30
R16	R17	R26	R52	R31
R19	R22	R35	R53	R32
R29	R33	R37	R54	R44
R36	R41	R43	R55	R47
R38	R46	R61	R57	R59
R62	R60	R69	R58	R74
R73	R65	R72	R59	R75

### ANEXO 2. Valores séricos de AST por grupos:

	SHAM	IQ	IF	IFHI	IFHR
	720	6720	3320	2570	2250
	120	4780	2200	3290	1720
	1050	16200	1500	2730	3680
	480	7390	3730	1230	4330
	190	10680	2970	930	2350
	280	11880	3740	2018	3360
	240	11240	1650	2769	1267
	210	5265	1260	2230	1710
	87	13790	1907	2340	1473
	187	11400	1326	1710	1730
<b>Média</b>	<b>356,4</b>	<b>9934,5</b>	<b>2360,3</b>	<b>2181,7</b>	<b>2387</b>
<b>DP</b>	<b>308,08</b>	<b>3763,79</b>	<b>990,44</b>	<b>728,3</b>	<b>1045,55</b>

**ANEXO 3. Valores séricos de ALT por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	120	5440	1390	1400	1160
	56	2850	1130	1830	770
	170	13050	1020	1590	2030
	120	4190	2100	705	2840
	80	7320	1510	540	1440
	140	10100	3280	959	2070
	80	7450	915	1595	865
	110	3708	670	1400	780
	43	7750	936	1250	708
	84	6856	1138	780	1066
<b>Média</b>	<b>100,3</b>	<b>6871,4</b>	<b>1408,9</b>	<b>1204,9</b>	<b>1372,9</b>
<b>DP</b>	<b>38,93</b>	<b>3079,05</b>	<b>767,77</b>	<b>434,92</b>	<b>717,19</b>

**ANEXO 4. Valores séricos de IL-6 por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
		1588	450	2556	548
		756	398	1674	1330
		4800	264	942	1444
		2500	566	488	1164
	250	4100	608	606	894
	338	1820	1516	1240	1658
	124	4800	524	1950	1360
	204	514	1400	2926	1172
	250	1050	1470	994	1400
	172	2126	2038	525	420
<b>Média</b>	<b>223</b>	<b>2405,4</b>	<b>923,4</b>	<b>1390,1</b>	<b>1139</b>
<b>DP</b>	<b>74,09</b>	<b>1618,39</b>	<b>618,34</b>	<b>860,85</b>	<b>400,53</b>

**ANEXO 5. Valores séricos de IL-10 por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
		551	177	518	123
		137	74	103	437
		817	35	181	233
		418	130	39	257
	0	1050	82	236	150
	0	512	406	393	313
	0	1050	88	254	164
	0	180	426	706	122
	0	373	329	373	440
	0	361	286	275	170
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>544,9</b>	<b>203,3</b>	<b>307,8</b>	<b>240,9</b>
<b>DP</b>	<b>0</b>	<b>327,35</b>	<b>146,23</b>	<b>198,23</b>	<b>120,58</b>

**ANEXO 6. Valores séricos de TNF-  $\alpha$  por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	0	152	26	74	66
	0	36	10	26	62
	0	66	20	14	66
	0	70	24	8	54
	0	124	48	4	28
	0	112	32	14	84
	0	104	0	20	26
	0	48	38	24	38
	0	48	20	52	51
	0	78	25	26	59
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>83,8</b>	<b>24,3</b>	<b>26,2</b>	<b>53,4</b>
<b>DP</b>	<b>0</b>	<b>37,8</b>	<b>13,52</b>	<b>21,38</b>	<b>18,25</b>



**ANEXO 7. Valores do Escore Histológico por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	2	12	3	3	10
	4	9	4	0	0
	2	13	1	0	2
	0	6	8	0	4
	1	12	6	0	5
	2	6	0	0	0
	0	7	0	0	2
	1	8	7	1	3
	1	12	4	3	0
	2	7	0	5	8
<b>Média</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>DP</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>

**ANEXO 8. Valores de Grau de Necrose por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	0	3	0	1	2
	1	2	1	0	0
	0	3	0	0	0
	0	1	2	0	1
	0	3	2	0	1
	0	1	0	0	0
	0	2	0	0	0
	0	2	2	0	1
	0	3	1	1	0
	0	2	0	1	2
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>DP</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>

**ANEXO 9. Valores da atividade de MPO por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	0,018	0,03	0,026	0,044	0,029
	0,05	0,036	0,032	0,042	0,03
	0,06	0,032	0,03	0,037	0,04
	0,022	0,037	0,04	0,042	0,05
	0,04	0,044	0,038	0,045	0,045
	0,035	0,043	0,04	0,04	0,036
	0,034	0,05	0,041	0,04	0,04
	0,051	0,036	0,045	0,043	0,036
	0,034	0,037	0,035	0,055	0,032
	0,033	0,028	0,028	0,036	0,03
<b>Média</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>
<b>DP</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>

**ANEXO 10. Valores da atividade de MDA por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	3,3	4,35	1,3	1,1	3
	3,5	1,52	2,25	2	1,1
	1,1	2,3	2,43	1,2	2,9
	1,2	2,9	3,4	1,1	3,7
	1,2	2,9	2,4	2,1	3,6
	2,24	3,53	2,9	2,3	1,3
	2,4	3,8	1,2	1,2	1,2
	4,13	3,75	2,7	1,1	1,1
	1,94	4,8	1,6	1,5	1,01
	1,4	1,9	1,5	1,1	2,1
<b>Média</b>	<b>2,24</b>	<b>3,18</b>	<b>2,17</b>	<b>1,47</b>	<b>2,1</b>
<b>DP</b>	<b>1,08</b>	<b>1,06</b>	<b>0,74</b>	<b>0,48</b>	<b>1,1</b>

**ANEXO 11. Valores séricos de HCO<sub>3</sub> por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	16,4	17,8	19,1	21,5	20,8
	20,1	14,7	19,5	22,7	18,4
	10,7	15,9	21,9	16,9	13,2
	21,3	19,7	20,6	22,7	24,1
	22,9	7,2	25,1	22	21,9
	16	21,3	19,4	21,9	20
	24,9	11,9	22,2	20	20,8
	22,5	22,5	19,3	19,5	20,5
	21,2	19,4	18,8	20,7	20,1
	18,3	8,6	15,2	20,5	17
<b>Média</b>	<b>19,43</b>	<b>15,9</b>	<b>20,11</b>	<b>20,84</b>	<b>19,68</b>
<b>DP</b>	<b>4,18</b>	<b>5,26</b>	<b>2,61</b>	<b>1,76</b>	<b>2,96</b>

**ANEXO 12. Valores séricos de SBE por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	-5,9	-5,8	-5,5	-2,3	-1,4
	-4,4	-9,8	-3,7	-1,8	-5,7
	-12,7	-11,3	-2,8	-7,7	-10,1
	-2,9	-4,2	-4,3	-1,2	0,7
	-1,8	-20,6	1,8	-2,9	-2,1
	-7,7	-2,3	-4,5	-2,2	-4,4
	1	-14,3	-2,3	-4,6	-3,9
	-1	-2,7	-4,2	-3,3	-3,3
	-1,5	-3,4	-5	-2,8	-5,5
	-7,5	-15,4	-11,2	-3,3	-6,9
<b>Média</b>	<b>-4,44</b>	<b>-8,98</b>	<b>-4,17</b>	<b>-3,21</b>	<b>-4,26</b>
<b>DP</b>	<b>4,08</b>	<b>6,31</b>	<b>3,22</b>	<b>1,83</b>	<b>3,04</b>

**ANEXO 13. Valores séricos de Sódio por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	140	130	137	137	137
	135	134	131	138	138
	127	138	135	143	137
	139	137	129	133	140
	135	136	130	135	136
	137	132	131	138	139
	135	129	131	138	136
	133	134	135	139	138
	133	132	139	139	136
	136	140	139	138	135
<b>Média</b>	<b>135</b>	<b>134,2</b>	<b>133,7</b>	<b>137,8</b>	<b>137,2</b>
<b>DP</b>	<b>3,62</b>	<b>3,55</b>	<b>3,77</b>	<b>2,62</b>	<b>1,55</b>

**ANEXO 14. Valores séricos de Potássio por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	5	5,2	4,4	3,7	4
	4,1	4	5,9	5	4,3
	5,3	7,1	4,7	4,4	8,7
	3,4	6	4,7	3,7	4,3
	4,1	5,5	4,6	3,9	4,5
	4	5,1	6,4	3,6	4,9
	3,8	5,9	4,4	5,4	5,5
	3,6	4,6	4	4,6	3,8
	3,7	4,8	3,8	4,8	4,4
	3,9	4,2	6,6	3,8	3,6
<b>Média</b>	<b>4,09</b>	<b>5,24</b>	<b>4,95</b>	<b>4,29</b>	<b>4,8</b>
<b>DP</b>	<b>0,6</b>	<b>0,93</b>	<b>0,99</b>	<b>0,64</b>	<b>1,47</b>

**ANEXO 15. Valores séricos de Cálcio por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	4,75	4,63	4,65	4,36	4,76
	4,55	3,98	4,33	4,48	5,02
	4,15	4,91	4,86	4,17	4,2
	5,03	4,64	4,43	4,14	4,16
	4,73	4,38	4,4	4,01	4,53
	3,88	4,18	4,32	4,66	4,6
	4,99	4,13	4,19	4,41	4,49
	4,53	4,84	4,48	4,31	4,7
	4,59	4,21	4,6	4,29	4,68
	4,88	3,31	4,97	4,7	4,81
<b>Média</b>	<b>4,61</b>	<b>4,32</b>	<b>4,52</b>	<b>4,35</b>	<b>4,6</b>
<b>DP</b>	<b>0,36</b>	<b>0,47</b>	<b>0,25</b>	<b>0,22</b>	<b>0,27</b>

**ANEXO 16. Valores séricos de Lactato por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	19	22	12	9	25
	15	18	16	15	19
	43	50	20	21	30
	7	27	9	20	20
	7	94	10	16	12
	15	34	17	11	9
	6	58	12	20	12
	8	11	13	14	12
	13	19	15	17	10
	19	27	39	12	11
<b>Média</b>	<b>15</b>	<b>36</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>DP</b>	<b>11</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>7</b>

**ANEXO 17. Valores séricos de Glicose por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	431	230	216	182	309
	403	171	219	265	249
	372	119	274	105	74
	300	117	244	235	154
	296	35	188	241	228
	328	139	233	225	192
	364	47	271	157	213
	389	224	176	178	202
	334	128	214	200	178
	319	49	263	202	221
<b>Média</b>	<b>353,6</b>	<b>125,9</b>	<b>229,8</b>	<b>199</b>	<b>202</b>
<b>DP</b>	<b>45,41</b>	<b>69,28</b>	<b>33,6</b>	<b>46,47</b>	<b>61,63</b>

**ANEXO 18. Valores da PAM por grupos:**

	<b>SHAM</b>	<b>IQ</b>	<b>IF</b>	<b>IFHI</b>	<b>IFHR</b>
	107	93,6	82,1	102,73	106
	87	86	110	92,46	90,05
	131	91,2	98,8	133,97	83,5
	131,67	105	97,4	124,22	87
	114	45,4	97,8	117,33	94,1
	149,2	95	81,7	109,89	103,98
	116	56,08	117,67	74,84	116,55
	150,8	121,02	97,82	83,7	117,2
	119,72	91,04	131,01	89,64	104,59
	134,88	119,56	108,01	117,2	152,06
<b>Média</b>	<b>124,13</b>	<b>90,39</b>	<b>102,23</b>	<b>104,6</b>	<b>105,5</b>
<b>DP</b>	<b>19,49</b>	<b>24,17</b>	<b>15,13</b>	<b>19,13</b>	<b>20,07</b>