MARIA PAULA SANTANA LIMA

**Efeitos do N2-Mercaptopropionilglicina na isquemia e reperfusão hepática em
ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eleazar Chaib

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Maria Paula Santana

Efeitos do N2-Mercaptopropionilglicina na
isquemia e reperfusão hepática em ratos / Maria
Paula Santana Lima. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Eleazar Chaib.

Descritores: 1.Isquemia 2.Reperfusão 3.Fígado
4.Mercaptopropionilglicina 5.Ratos Wistar
6.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-290/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico esta dissertação ao meu pai, in memoriam, que infelizmente perdi ao longo desta caminhada, por ter sido o meu braço direito e principal alicerce em minha vida pessoal e acadêmica até então.

Ao meu companheiro e melhor amigo Luis Artur, que nesse momento importante e difícil da minha vida pessoal e profissional me amparou, continuou me incentivando e que nunca me deixou fraquejar, obrigada por sempre me mostrar o melhor caminho a ser seguido.

Agradecimentos

À amiga e colega de profissão Dra. Laila Massad por me apresentar o universo apaixonante da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao meu orientador Professor Doutor Eleazar Chaib, por abrir as portas do laboratório para mim e me proporcionar esta oportunidade. Obrigada por me passar ensinamentos, me preparar e fazer com que eu sempre me sentisse bem acolhida.

Um agradecimento especial à Dra. Ana Maria Coelho que nunca hesitou em me ajudar e esteve presente sempre que precisei.

À Sandra Sampietre que tem uma destreza brilhante para operar estes pequenos animais e que me ensinou tudo com muita paciência.

Obrigada Dra. Rosely Patzina, por realizar os exames histopatológicos com rapidez e competência.

À secretária da Pós Graduação Vilma Libério pelo trabalho e competência.

Enfim à todos do LIM 37, que de alguma forma fizeram parte desta caminhada meu muito obrigada.

Normalização adotada:

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação- SBD/FMUSP; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 Aspectos Éticos	7
3.2 Animais de experimentação	7
3.3 Delineamento experimental	8
3.3.1 Anestesia	10
3.3.2 Cirurgia.....	11
3.4 Coleta de materiais para análise	13
3.5 Eutanásia	14
3.6 Descarte dos animais	14
3.7 Análises laboratoriais.....	15
3.7.1 Dosagens das transaminases.....	15
3.7.2 Avaliação de permeabilidade vascular pulmonar.....	15
3.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático.....	16
3.7.4 Análise histológica do fígado	17
3.8 Análise estatística	19
4.RESULTADOS.....	20
4.1 Dosagem das transaminases	20
4.2 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar	22

4.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático	23
4.4 Análise histológica do fígado	24
4.4.1 Análise histológica dos lobos hepáticos isquêmicos.....	24
4.4.2 Análise histológica dos lobos não isquêmicos	25
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES	29
7. ANEXOS	30
8. REFERÊNCIAS.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão Especial no Uso de Animais
I/R	Isquemia e reperfusão
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MDA	Malondialdeído
N2-MPG	N2-Mercaptopropionilglicina
Na⁺K⁺Atpase	Bomba sódio potássio dependente de ATP
pH	Potencial hidrogeniônico
POP's	Procedimentos Operacionais Padronizados
TBARS	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca⁺	Cálcio
KCl	Cloreto de Potássio
kg	Kilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanomolar
°C	Graus Celsius
Rpm	Rotações por minuto
U	Unidade
V	Volts
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de morte celular por edema	3
Figura 2. Mecanismo de geração de radicais livres adaptado	4
Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos não isquêmicos Controle e Sham	9
Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos isquêmicos Salina e N2-MPG	9
Figura 5. Procedimento de intubação orotraqueal	10
Figura 6. Identificação do hilo hepático comum	11
Figura 7. Clampeamento do hilo hepático comum com pinça atraumática	12
Figura 8. Coleta de amostra sanguínea por punção cardíaca	13
Figura 9. Valores das médias $\pm$ desvio padrão das dosagens séricas de AST. Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG ...	20
Figura 10. Valores das médias $\pm$ desvio padrão das dosagens séricas de ALT. Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG ...	21
Figura 11. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da concentração do corante Azul de Evans no tecido pulmonar. Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG	22
Figura 12. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da concentração de TBARS no tecido hepático isquêmico dos Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG	23
Figura 13. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da concentração de TBARS no tecido hepático não isquêmico dos Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG	23
Figura 14. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da Necrose de coagulação no tecido hepático isquêmico dos Grupos de ratos Salina e N2-MPG	24
Figura 15. Valores das médias $\pm$ desvio padrão do escore total de lesões no tecido hepático isquêmico dos Grupos de ratos Salina e N2-MPG	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Metódo para avaliação histológica das lesões de isquemia e reperfusão hepáticas proposto por Quireze <i>et al.</i>	18
-----------------	---	----

RESUMO

Lima MPS. *Efeitos do N2-Mercaptopropionilglicina na isquemia e reperfusão hepática em ratos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A isquemia e reperfusão (I/R) ocorre quando há privação de oxigênio e posterior reestabelecimento (reperfusão). Este processo causa desordens orgânicas e funcionais, que se agravam no período da reperfusão com a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). É uma situação recorrente em cirurgias de transplante de órgãos. Os mecanismos antioxidantes endógenos são insuficientes após longos períodos de isquemia, por este motivo há necessidade de utilizarmos antioxidantes exógenos. O N2-mercaptopropionilglicina (N2-MPG) é um composto tiólico sintético que inibe a conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase, diminuindo as taxas de formação de radicais livres. O efeito protetor do N2-MPG, já foi testado, e seus efeitos varredores continuam desconhecidos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do N2-MPG na isquemia e reperfusão hepática em fígados de ratos, quando aplicado após a isquemia e antes da reperfusão. **Métodos:** Ratos Wistar machos, mantidos em ventilação controlada, foram submetidos à isquemia hepática parcial, através de uma hora de clampeamento dos lobos médio e anterior lateral esquerdo, seguido por 4 horas de reperfusão. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle (n=6): sem procedimento cirúrgico, Sham (n=6): submetidos à manipulação cirúrgica do fígado, Salina (n=11): receberam solução salina 10 minutos antes da reperfusão e N2-MPG (n=11) receberam N2-MPG (100mg/kg) 10 minutos antes da reperfusão. Quatro horas após a reperfusão, amostras sanguíneas foram coletadas para determinação das transaminases (ALT e AST), amostras de tecido hepático para determinação de MDA (malondialdeído) e avaliação histopatológica, além de tecido pulmonar para avaliação da permeabilidade vascular. **Resultados:** Os grupos Salina e N2-MPG apresentaram altos níveis séricos de ALT e AST, e alta taxa de necrose na avaliação histopatológica em relação aos grupos que não foram submetidos à I/R. Os animais dos grupos Controle, Sham e N2-MPG apresentaram menor permeabilidade vascular pulmonar, quando comparados aos animais do Grupo Salina. **Conclusão:** N2-MPG exerceu efeito protetor à distância (reduzindo a permeabilidade vascular pulmonar), porém não protegeu o fígado quando aplicado depois da isquemia e antes da reperfusão neste modelo experimental.

Descritores: Isquemia, Reperfusão, Fígado, Mercaptopropionilglicina, Ratos Wistar, Estresse Oxidativo.

SUMMARY

Lima MPS. *Effects of N-(2-Mercaptopropionyl) glycine on hepatic ischemia-reperfusion in rats [Dissertation]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introduction: The ischemia process causes functional and organic disorders, with increases on the reperfusion moment releasing reactive oxygen species (ROS), this is called ischemia/reperfusion (I/R), it happens in every surgery related to organ transplantation. The endogenous mechanisms are insufficient after long periods of ischemia, then we need to use exogenous antioxidants. The N-2 Mercaptopropionylglycine (N2-MPG) is a synthetic compound which inhibits the conversion of the enzyme xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, decreasing oxygen free radicals rates. The protective effect of MPG had been tested, but its scavenger effects are still unknown. **Aim:** The aim of this study was to evaluate the effects of N2-MPG on I/R in rats liver, when applied after ischemia and before reperfusion.

Methods: Wistar male rats, kept under mechanical ventilation, underwent partial liver ischemia performed by one hour pedicle clamping of medium and left anterior lateral segments, followed by 4 hours of reperfusion. Animals were divided into 4 groups: Control (n=6): without ischemia procedure, Sham (n=6): submitted to surgical manipulation of the liver, Saline (n=11): received saline solution 10 minutes before reperfusion, and N2-MPG (n=11): received N2-MPG (100mg/kg) 10 minutes before reperfusion. Four hours after reperfusion, blood were collected for determinations of AST and ALT. Liver tissues were assembled for malondialdehyde (MDA) and histopathological evaluation, pulmonary vascular permeability was also determined.

Results: Saline and N2-MPG group increased ALT and AST serum rates, necrosis on histopathological evaluation. Therefore, pulmonary vascular permeability decreased in Control, Sham and N2-MPG group when compared to Saline group. **Conclusion:** N2-MPG exerted a protective effect at a distance (reducing pulmonary vascular permeability). However, it did not protect the liver when applied after ischemia and before reperfusion in this experimental model.

Descriptors: Ischemia, Reperfusion, Liver, Mercaptopropionylglycine, Wistar Rats, Oxidative Stress.

1. INTRODUÇÃO

A isquemia e reperfusão (I/R) ocorre quando o aporte de oxigênio é interrompido (isquemia) e recobrado posteriormente (reperfusão). É um processo multifatorial e contínuo, que causa lesão celular culminando em perda da função orgânica¹. Estes períodos de isquemia sucedidos por reperfusão levam ao estresse oxidativo, ou seja, ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), denominadas radicais livres no meio intracelular.² Os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron livre em sua camada mais externa, por este motivo são moléculas instáveis e altamente reativas, elas tendem a iniciar reações em cadeia que afetam lipídios e proteínas de forma irreversível e reações deletérias que podem levar à citotoxicidade e até mesmo disfunção celular.³

A lesão causada por I/R hepática é um processo complexo que envolve diversos tipos celulares e mediadores moleculares em diversas vias, e o dano celular ocorre tanto durante a isquemia quanto durante a reperfusão.⁴

As células de Kupfer, os sinusóides e os hepatócitos entram em sofrimento com o consumo de glicogênio, há ativação da glicólise anaeróbia, que é menos eficiente, gera menos energia, e produz substâncias ácidas como o ácido láctico e fosfatos inorgânicos e com isto há queda do pH (potencial hidrogeniônico) intracelular. Além disso a depleção de adenosina trifosfato (ATP), acarreta na falha da bomba sódio potássio dependente de ATP ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$), levando ao acúmulo de sódio (Na^+) no meio intracelular que resulta em edema (figura 1). Há diminuição da concentração de óxido nítrico (potente vasodilatador), e concomitantemente aumento de potentes vasoconstritores como a endotelina e tromboxanos que corroboram com a diminuição da luz dos sinusóides, além disso, no momento da reperfusão ocorre agregação plaquetária e adesão de neutrófilos resultando em estase da microcirculação.⁴

Figura 1. Mecanismo de morte celular por edema ⁴

As células de Kupfer são ativadas durante a isquemia e reperfusão pelo sistema complemento de forma direta em resposta à injúria causada pela I/R hepática e produzem EROs e citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) que se espalham e são responsáveis por propagar as injúrias por isquemia e reperfusão. O TNF- α e a IL-1 β também ativam os linfócitos T e CD-4, estimulam as células endoteliais sinusoidais a expressarem moléculas de adesão na superfície celular e agregação plaquetária, além de estimularem os hepatócitos a produzirem espécies EROs que contribuem para o próprio dano.^{4,5}

Alterações no balanço de cálcio (Ca⁺), também desempenham papel fundamental nas lesões de I/R. Além do edema celular citado anteriormente pelo aumento de Na⁺ no meio intracelular, há falha do trocador Na⁺/Ca⁺, e aumento do influxo de Ca⁺ no meio intracelular. O Ca⁺ promove a ativação de diversas enzimas como fosfolipases que causam lesão direta em componentes celulares, bem como algumas proteases que convertem a enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase que é a forma geradora de EROs (Figura 2).^{6,7}

Figura 2. Mecanismo de geração de radicais livres adaptado ⁷

A membrana celular é a estrutura mais suscetível à ação das espécies reativas de oxigênio, ocorrendo peroxidação lipídica, que desencadeiam alterações na estrutura e permeabilidade celular tendo como consequência a perda da seletividade na troca iônica, liberação de enzimas hidrolíticas e lisossomas, e formação de produtos citotóxicos como malonaldeído (MDA), resultando em morte celular. ⁸

As lesões decorrentes de I/R não se limitam apenas aos órgãos acometidos pela isquemia, por se tratar de um fenômeno tipicamente inflamatório, pode desencadear lesões à distância em outros órgãos como os pulmões⁹, coração¹⁰ e rins¹¹ por exemplo.

As cirurgias de transplante de fígado invariavelmente levam o órgão a uma situação de I/R de tempo variável. ^{12,13} As injúrias decorrentes do período de isquemia e posterior reperfusão desencadeados, são diretamente proporcionais ao sucesso da cirurgia e os mecanismos de defesa endógenos (superoxidodismutase, glutathion- peroxidase, catalase, alfa-

tocoferol e coenzima-Q10), são insuficientes após longos períodos de isquemia. Por este motivo o fenômeno I/R é exhaustivamente pesquisado, e diversas drogas são testadas com o objetivo de minimizar seus efeitos deletérios.⁸

O N2-mercaptopropionilglicina (N2-MPG) tem sido utilizado como antioxidante por diversos autores em lesões de I/R.^{7,14-17} Trata-se de um composto tiólico sintético, que exerce efeitos benéficos contra lesões de reperfusão através da inibição da conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase, além de suas propriedades varredoras de radicais livres.¹⁷

2. OBJETIVO

Estudar os efeitos do N2-mercaptopropionilglicina no processo de isquemia e reperfusão hepática quando administrado após a isquemia e antes da reperfusão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – LIM/37 da Disciplina de Cirurgia e Transplante de Fígado do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o Protocolo 133/14. As normas de proteção e cuidado aos animais de experimentação foram respeitadas de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press. 8th ed. Washington, D.C., 2011.*¹⁸

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 34 *Rattus albinus*, machos, da linhagem Wistar, com peso médio de 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos no Laboratório de Investigação Médica – LIM 37, mantidos em grupos de 3 ratos por gaiola, em ambiente com temperatura controlada entre 20° e 22° C, alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA) e água filtrada *ad libitum*.

3.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo Controle (Controle): Constituído por 6 animais, que foram anestesiados, e receberam o Azul de Evans (Sigma-Chemical Company, USA), 20 mg/kg, através da veia peniana, e após 15 minutos foram eutanasiados para coleta de material.

Grupo Sham (Sham): Constituído por 6 animais, que foram anestesiados, intubados, e submetidos à laparotomia pela linha média, foi realizada manipulação hepática com hastes de algodão, e não foram submetidos à isquemia. Após 45 minutos receberam azul de Evans através da veia peniana e após 15 minutos da aplicação do azul de Evans foram eutanasiados para coleta de material.

Grupo Salina (Salina): Constituído por 11 animais, que foram anestesiados, intubados, e submetidos ao procedimento cirúrgico completo (descrito a seguir). Foram submetidos à 1 hora de isquemia hepática parcial. Posteriormente foi administrado 0,5 mL de Solução Salina (NaCl 0,9%) através da veia peniana 10 minutos antes da reperusão. Após 3 horas e 45 minutos de reperusão receberam azul de Evans através da veia peniana. Às 4 horas de reperusão foram eutanasiados para coleta de material.

Grupo Mercaptopropionilglicina (N2-MPG): Constituído por 11 animais, que foram anestesiados, intubados, e submetidos ao procedimento cirúrgico completo (descrito a seguir). Foram submetidos à uma hora de isquemia parcial. Posteriormente administrados 100mg/Kg de N2-MPG (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), diluídos em solução salina na concentração de 60mg/mL através da veia peniana 10 minutos antes da reperusão. Após 3 horas e 45 minutos de reperusão receberam azul de Evans através da veia peniana. Às 4 horas de reperusão foram eutanasiados para coleta de material.

Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos não isquêmicos Controle e Sham

Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos isquêmicos Salina e N2-MPG

3.3.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália) na dose de 30mg/kg, e cloridrato de xilazina 2% (Rompum®, Bayer), na dose de 10mg/kg. Em seguida foram submetidos à intubação orotraqueal com cateter n°16 (Jelco®), e à ventilação mecânica com frequência de 60 rpm e volume corrente de 0,08 ml por grama de peso (Harvard Rodent Ventilator model 683, USA), exceto os animais do grupo controle.

Figura 5. Procedimento de intubação orotraqueal

3.3.2 Cirurgia

A cirurgia iniciou-se por laparotomia mediana que se estendeu por aproximadamente 4 cm à partir do apêndice xifóide (Grupos Sham, Salina, N2-MPG). Em seguida foi realizada a dissecação e oclusão (Grupos Salina e N2-MPG) com pinça microvascular atraumática do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral esquerdo, sendo provocada uma isquemia de aproximadamente 70% do fígado. Essa técnica mantém a perfusão do lobo caudado superior, do caudado inferior, do superior direito e do inferior direito, impedindo a estase venosa com isquemia intestinal, que pode ocorrer no caso de oclusão total do hilo hepático, permitindo que se avalie exclusivamente as lesões secundárias à I/R.^{19,20} As incisões abdominais (Grupos Sham, Salina, N2-MPG) foram suturadas com fio *Mononylon*® 4-0 em pontos simples separados durante quase todo período de reperfusão prevenindo a desidratação dos animais.

Figura 6. Identificação do hilo hepático comum

Figura 7. Clampeamento do hilo hepático comum com pinça atraumática

Para analgesia pós-operatória, foi aplicado cloridrato de tramadol (Cristália) na dose de 5mg/kg por via subcutânea. Após uma hora de isquemia normotérmica, o abdômen foi reaberto e a pinça removida (Grupos Salina e N2-MPG), permitindo a reperusão dos lobos hepáticos isquêmicos.

Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos aquecidos com lâmpada halógena de 45W e 127V.

Depois da recuperação da anestesia e da extubação orotraqueal os animais dos grupos Sham e N2-MPG foram acondicionados em gaiolas em grupo (3 animais/gaiola) com água *ad libitum*.

3.4 Coleta de materiais para análise

Quinze minutos antes de completar 4 horas de reperfusão hepática, os animais dos grupos Salina e N2-MPG foram novamente anestesiados com cloridrato de cetamina e xilazyna na mesma dosagem anterior e receberam o corante azul de Evans (Sigma-Chemical Company, USA), na dose de 20 mg/kg, administrado pela veia peniana. Completando quatro horas de reperfusão hepática a cavidade abdominal foi reaberta e foi realizada toracotomia via esternal e 5 mL de sangue foram coletados por punção cardíaca. Posteriormente os animais foram eutanasiados.

Nos animais dos grupos Controle e Sham o corante azul de Evans foi administrado pela veia peniana 15 minutos antes de serem eutanasiados para a coleta de material.

Figura 8. Coleta de amostra sanguínea por punção cardíaca

3.5 Eutanásia

Ao final do procedimento, os animais foram eutanasiados durante a anestesia por secção da aorta abdominal e da veia cava inferior, método adjuvante de anestesia e exanguinação, de acordo com as normas do *American Veterinary Medical Association* (AVMA Guidelines for the Euthanasia for Animals - 2013).²¹ Após foi realizada a remoção do fígado, os lobos isquêmicos (mediano e lateral esquerdo) dos grupos Salina e N2-MPG e os não-isquêmicos (caudado superior, caudado inferior, superior direito e inferior direito) de todos os grupos, cujas amostras foram enviadas para análise histológica e dosagem do conteúdo de malondialdeído (MDA). Em seguida, a artéria pulmonar foi cateterizada via ventrículo direito com cateter de 2,0 mm de diâmetro (Silastic, Dow Corning, n° 602.175), e o pulmão foi lavado com 30 a 50 mL de solução salina fisiológica, administrada com velocidade de 10 mL/min. Os pulmões removidos foram encaminhados para extração do azul de Evans.

As dosagens das transaminases AST e ALT foram realizadas nas amostras de sangue coletadas de todos os animais.

3.6 Descarte dos animais

Os animais foram acondicionados em sacos brancos leitosos com o símbolo infectante, devidamente identificados com as etiquetas de animais para experimentação e alojados no freezer do laboratório, onde foram retirados posteriormente pela empresa contratada, de acordo com as normas do Guia dos POPs (Procedimentos Operacionais Padronizados) de Resíduos de Serviços de Saúde estabelecidas pela Diretoria Executiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em conjunto com a Comissão de Gerenciamento de Resíduos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (2013).²²

3.7 Análises laboratoriais

3.7.1 Dosagens das transaminases

As dosagens das transaminases hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas pelo método ultravioleta otimizado (COBAS MIRA, Roche), os resultados foram expressos em U/L, conforme a *International Federation of Clinical Chemistry*, e foram avaliadas como indicadores de lesões hepáticas.

3.7.2 Avaliação de permeabilidade vascular pulmonar

O complexo azul de Evans-albumina tem a finalidade de avaliar a permeabilidade vascular através de seu extravazamento intersticial, facilitado pelo aumento da permeabilidade vascular capilar pulmonar decorrente do processo inflamatório.

A avaliação foi realizada através da análise de um fragmento de cada animal coletado e armazenado em tubo de ensaio com formamida (BDH Labs, England) na dose de 4µg/mg de tecido, pelo período de 24 horas, conservado em temperatura ambiente. O corante extraído foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro ELX 808 Ultra Microplate Reader (Bio-tek Instruments, Inc, USA) com comprimento de onda de 620nm.

Os resultados foram expressos em mg de Azul de Evans/g de tecido seco.²³

3.7.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático

A avaliação da lipoperoxidação lipídica nos lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos foi realizada através da concentração de malondialdeído (MDA) por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl), centrifugadas, e no sobrenadante foi adicionada solução contendo ácido tiobarbitúrico, duodecilsulfato de sódio, ácido acético glacial e água destilada. A mistura foi aquecida a 90 °C (Celsius) por 45 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos. As concentrações dos produtos da peroxidação lipídica foram expressas através da concentração de TBARS. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína.²⁴

3.7.4 Análise histológica do fígado

As amostras de tecido hepático isquêmicos e não-isquêmicos foram fixadas em formol salino a 10% e processadas como de rotina. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina e submetidos à um único patologista em estudo cego, que analisou as seguintes variáveis morfológicas (quadro 1): a) tumefação hepatocelular, definida como o alargamento e clareamento citoplasmáticos, eventualmente com obliteração sinusoidal, fenômeno potencialmente reversível, associado à entrada de água intracelular; b) retração hepatocelular, definida como picnose nuclear e eosinofilia citoplasmática com redução do volume celular, associada à perda de água intracelular, fenômeno irreversível que, associado aos mecanismos fisiológicos de morte celular, pode ser a expressão fenotípica de apoptose; c) esteatose hepatocelular, definida como a presença de gotículas claras e bem delimitadas intracelulares; d) necrose de coagulação, definida como citoplasmas róseos de limites imprecisos com núcleos picnóticos ou desprovidas de núcleo; e) inflamação lobular, definida pela presença de áreas de necrose focal permeadas por células inflamatórias; f) inflamação portal, definida pelo aumento da população de células inflamatórias no espaço porta; g) celularidade sinusoidal, definida como hiperplasia ou hipertrofia das células sinusoidais.

As variáveis foram semiquantificadas de zero a três, onde zero correspondeu à ausência da variável pesquisada; um, à presença discreta e focal; dois, à presença moderada; e três, à presença intensa (Quadro 1).²⁵

Classificação da lesão	Grau
Tumefação	0 - ausente
	1 - leve
	2 - moderado
	3 - severo
Retração	0 - ausente
	1 - leve
	2 - moderado
	3 - severo
Necrose	0 - ausente
	1 - leve
	2 - moderado
	3 - severo
Celularidade Sinusoidal	0 - ausente
	1 - leve
	2 - moderado
	3 - severo
Inflamação Portal	0 - ausente
	1 - leve
	2 - moderado
	3 - severo
Inflamação lobular	0 - ausente
	1 - leve
	2 - moderado
	3 - severo

Quadro 1. Método para avaliação histológica das lesões de isquemia e reperfusão hepáticas proposto por Quireze *et al*²⁵

3.8 Análise estatística

Os resultados das dosagens das transaminases AST e ALT, de MDA e azul de Evans foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP), e foram analisados pelo teste de Análise de variância (ANOVA). Nos grupos em que houve diferença estatística, foi aplicado o teste de TUKEY.

Os resultados da análise histológica do fígado foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o Programa Estatístico GraphPad Prism versão 4.0 e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

Os resultados foram apresentados em forma de gráficos.

4.RESULTADOS

4.1 Dosagem das transaminases

As transaminases AST e ALT apresentaram aumento significativo nos animais dos grupos que foram submetidos à I/R (Salina e N2-MPG) quando comparadas com os grupos não isquêmicos (Controle e Sham).

Os animais do grupo N2-MPG apresentaram diferença estatística quando comparados aos animais dos grupos Controle e Sham, porém sem apresentar resultado estatisticamente diferente quando comparado aos animais do grupo Salina.

Os grupos Sham e Controle não apresentaram diferenças estatísticas entre si na dosagem das transaminases (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Valores das médias $\pm$ desvio padrão das dosagens séricas de AST. Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG

Figura 10. Valores das médias $\pm$ desvio padrão das dosagens séricas de ALT. Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG

4.2 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar

Observamos aumento estatisticamente significativo dos resultados da extração do azul de Evans no tecido pulmonar dos animais do grupo Salina, quando comparados aos resultados observados nos animais dos grupos Controle e Sham e N2-MPG (Figura 11).

Figura 11. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da concentração do corante Azul de Evans no tecido pulmonar. Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG

4.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático

Os resultados dos níveis de TBARS no tecido hepático dos lobos isquêmicos e não isquêmicos dos grupos N2-MPG e Salina, não apresentaram diferença estatística quando comparados aos grupos Controle, Sham, e entre si (Figuras 12 e 13).

Figura 12. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da concentração de TBARS no tecido hepático isquêmico dos Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG

Figura 13. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da concentração de TBARS no tecido hepático não isquêmico dos Grupos de ratos Controle, Sham e submetidos a I/R hepática: Salina e N2-MPG

4.4 Análise histológica do fígado

4.4.1 Análise histológica dos lobos hepáticos isquêmicos

O índice de necrose de coagulação e a soma dos escores dos lobos isquêmicos foi significativamente menor nos grupos Controle e Sham quando comparados com os animais dos grupos com I/R (Salina e N2-MPG). Não houve diferença entre os grupos Salina e N2-MPG (Figura 14). Os outros parâmetros analisados, como tumefação, retração, esteatose, inflamação lobular e portal, e celularidade sinusoidal não apresentaram diferença estatística quando comparados os animais dos grupos Salina e MPG (Figura 15).

Figura 14. Valores das médias $\pm$ desvio padrão da Necrose de coagulação no tecido hepático isquêmico dos Grupos de ratos Salina e N2-MPG

Figura 15. Valores das médias $\pm$ desvio padrão do escore total de lesões no tecido hepático isquêmico dos Grupos de ratos Salina e N2-MPG

4.4.2 Análise histológica dos lobos não isquêmicos

Não foi encontrada necrose de coagulação nos lobos hepáticos não isquêmicos nos grupos Sham, Salina e N2-MPG

Os outros parâmetros analisados, como tumefação, retração, esteatose, inflamação lobular e portal, e celularidade sinusoidal não apresentaram diferença estatística entre os grupos Sham, Salina e N2-MPG.

5. DISCUSSÃO

As lesões causadas pelo fenômeno de I/R culminam em morte celular do órgão acometido, bem como podem acometer órgãos a distância por desencadear um processo inflamatório sistêmico.⁹⁻¹¹

Longos períodos de isquemia seguidos por reperfusão são altamente lesivos ao organismo, grandes quantidades de EROs são formadas e os mecanismos de defesas endógenos são insuficientes para combater os efeitos causados por esta liberação.⁸

Considerando a importância e gravidade das lesões causadas por I/R, diversas drogas foram testadas com o objetivo de minimizar estes efeitos.^{7,14-17,26-38, 42-43}

O Laboratório de Investigação Médica 37 (LIM/37) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, local em que o presente estudo está inserido, apresenta uma linha de pesquisa bem estabelecida sobre as lesões de I/R hepáticas. Dentro desta linha de pesquisa, vários projetos e teses têm sido desenvolvidos e tem propiciado melhor entendimento da fisiopatologia hepática para o tratamento dessas lesões de I/R.^{7, 29,31-43}

No cenário das moléculas capazes de interferir no processo deletério de I/R apresenta-se o N2-mercaptopropioniglicina (N2-MPG), um composto tiólico sintético, que exerce efeitos benéficos contra as lesões de reperfusão através de suas propriedades varredoras de radicais livres.^{14,30}

O efeito protetor do N2-MPG já foi testado com sucesso em I/R em ratos com hipertrofia cardíaca¹⁴, em enxertos cutâneos de ratos¹⁵, pancreatite aguda experimental¹⁶, e isquemia e reperfusão hepática em ratos⁷. Tal efeito antioxidante ocorre por inibição da conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase, reduzindo o volume de formação de radicais livres. Sua meia vida plasmática é de 7 minutos e o seu mecanismo varredor permanece desconhecido.¹⁷

Em estudo anterior realizado por ABDO *et al.*(2003), o N2-MPG foi

utilizado no período pré-isquêmico, e os resultados foram positivos, os animais do grupo tratado com N2-MPG obtiveram menor aumento de transaminases quando comparados com o grupo dos animais sem tratamento, além de baixos graus de lesões na avaliação histopatológica.⁷

Considerando o efeito varredor, em estudo realizado por El-Missiry *et al.*(2001), concluiu-se que o N2-MPG possui potencial antioxidativo que pode proteger o fígado e coração contra a toxicidade oxidativa aguda. Este efeito protetor pode ocorrer pelo alto potencial de oxi-redução dos grupos sulfidrilas que limitam a atividade dos radicais livres.²⁶

Comparando o presente estudo, à pesquisa de Abdo *et al.*⁷, em relação à lesão hepática, este estudo não logrou êxito ao aplicar a droga no período pós-isquêmico. O resultado obtido de altos níveis de transaminases, MDA, e os resultados histopatológicos que demonstram grande perda de hepatócitos concluem esta afirmação.

Abdo *et al.*⁷ obtiveram melhores resultados nestes quesitos aplicando a droga no período pré-isquêmico, beneficiando-se dessa forma dos efeitos protetores. Portanto hipoteticamente após instalada a lesão isquêmica no órgão em questão, o N2-MPG não exerce efeitos protetores.

Os resultados dos testes que avaliam a permeabilidade vascular pulmonar (azul de Evans) neste estudo, demonstraram que o N2-MPG exerce efeito benéfico nas lesões a distância, pois quando comparamos os grupos N2-MPG aos grupos que não sofreram isquemia (Controle e Sham), não há diferença estatística. Bem como quando comparamos o grupo N2-MPG ao Grupo Salina, o aumento da permeabilidade vascular pulmonar no grupo Salina é bem evidente.

Tal evento pode ser atribuído ao seu efeito varredor de radicais livres, que impede a ação destes antes de causarem lesões mais graves como estabelecido por El-Missiry *et al.*(2001). Impedindo a ação dos radicais livres, o N2-MPG consequentemente inibe/reduz a resposta inflamatória sistêmica, portanto há possibilidade de o N2-MPG atuar em órgãos à distância de forma

indireta, amenizando a ativação de interleucinas, que apresentam papel fundamental nas lesões pulmonares segundo estudo de Takeuchi *et al.*⁹, consequentemente reduzindo as lesões decorrentes da isquemia e reperfusão hepática.

O presente trabalho esclareceu em partes os efeitos varredores e protetores do N2-MPG, deixando a dúvida se os efeitos benéficos que reduziram a permeabilidade pulmonar deve-se ao efeito protetor, por ser uma lesão que leva um tempo maior para se instalar, ou por sua característica varredora de radicais livres citada anteriormente. Esta dúvida poderia ser elucidada em um trabalho complementar, um pouco mais complexo envolvendo marcadores de radicais livres por exemplo.

O N2-MPG é uma droga eficaz na proteção de órgãos submetidos à I/R, que poderia ser utilizada em pacientes submetidos à transplantes com objetivo de proteger o órgão antes da isquemia, bem como em pacientes com processos isquêmicos já instalados com objetivo de proteger os pulmões de um eventual edema.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais do presente estudo, quanto às alterações de I/R hepática chegou-se às seguintes conclusões.

O N2-MPG não exerce efeito protetor hepático quando aplicado após isquemia e antes da reperfusão. Entretanto reduz o edema pulmonar decorrente deste fenômeno.

7. ANEXOS

Anexo A. Resultados do Grupo Controle.

Rato	AST	ALT	*MDA N. ISQ	AZUL DE EVANS
P29	240	120	3.53	33.07
P33	P34	P35	P36	P37
P45	110	55	3.91	148.63
P46	115	75	2.83	165.84
P47	110	60	2.37	63.9
P48	95	80	4.53	29.4
média	134	78	3.43	88.16
desvio padrão	70	36	1.45	62.24

*MDA não isquêmico

Anexo B. Resultados do Grupo Sham

Rato	AST	ALT	*MDA N. ISQ	AZUL DE EVANS
P28	190	100	3.36	26.22
P39	160	56	2.32	15.89
P40	80	28	2.27	115.9
P41	124	48	4.79	65.36
P43	120	72	4.9	185.14
P44	128	56	3.3	169.14
Média	134	60	3.49	96.27
Desvio Padrão	34	22	1.04	66

*MDA não isquêmico

Anexo C. Resultados do Grupo Salina

Rato	AST	ALT	*MDA ISQ.	**MDA N. ISQ	AZUL DE EVANS
P3	3298	2923	2.27	4.73	646.24
P5	3333	2900	5.61	3.67	413.95
P7	3130	3590	3.68	3	423.68
P9	4625	3655	3.67	4.94	316.58
P13	3130	2780	4.94	4.17	55.42
P14	5220	3965	2.86	2.8	60.8
P17	6670	6590	8.87	1.95	609.52
P21	2360	2190	2.53	4.44	495.18
P27	1630	1570	3.76	3.44	223.23
P36	1450	980	4.22	2.81	204.88
P37	3210	2210	3.83	4.29	257.61
P38	930	1210	4.06	1.71	98.29
média	3249	2880	4.19	3.52	317.11
desvio padrão	1569	1446	1.67	0.98	194.35

*MDA isquêmico

**MDA não isquêmico

Anexo D. Resultados do Grupo N2-Mercaptopropionilglicina

Rato	AST	ALT	*MDA ISQ.	**MDA N. ISQ	AZUL DE EVANS
P2	2245	1453	5.82	5.61	55.26
P4	1700	1100	6.7	4	174.62
P6	6930	5740	5.05	4.46	417.26
P8	4055	2795	3.61	3.22	210
P10	5230	4050	4.45	3.81	210.02
P11	4100	2140	8.46	8.43	112.59
P16	1830	1605	1.97	1.47	115
P19	5100	3700	2.78	4.41	184.75
P20	2360	2190	3	1.91	57.14
P25	6,800	7,200	3.24	1.29	52.74
P34	3030	1540	4.48	2.97	231.41
P35	2510	2310	5.16	4.65	183.33
média	3824	2985	4.56	3.85	167.01
desvio padrão	1773	1796	1.75	1.88	97.63

*MDA isquêmico

**MDA não isquêmico

Anexo E. Histopatológico do Grupo Controle

Rato	Tumefação	Retração	Esteatose	Necrose	Inflamação lobular	Inflamação portal	Celularidade Sinusoidal	Soma
P29	0	0	0	0	0	0	0	0
P35	0	0	0	0	0	0	0	0
P45	0	0	0	0	0	0	0	0
P46	0	0	0	0	0	0	0	0
P47	0	0	0	0	0	0	0	0
P48	0	0	0	0	0	1	0	1
N=6								
Média	0	0	0	0	0	0.16	0	0.50
Desvio								
						0.40		0.54
Padrão								

Anexo F. Histopatológico do Grupo Sham

Rato	Tumefação	Retração	Esteatose	Necrose	Inflamação lobular	Inflamação portal	Celularidade Sinusoidal	Soma
P28	0	0	1	0	0	0	0	1
P39	0	0	0	0	0	0	0	0
P40	0	0	1	0	0	0	0	1
P41	0	0	0	0	0	1	0	1
P43	0	0	1	0	0	0	0	1
P44	0	0	0	0	0	0	0	0
N=6								
Média	0	0	0.50	0	0	0.16	0	0.60
Desvio Padrão			0.54			0.40		0.54

Anexo G. Histopatológico dos lobos não isquêmicos do Grupo

Salina

Rato	Tumefação	Retração	Esteatose	Necrose	Inflamação lobular	Inflamação portal	Celularidade Sinusoidal	Soma
P3	0	0	1	0	0	0	0	1
P5	0	0	1	0	0	0	0	1
P7	0	0	1	0	0	0	0	1
P9	0	0	0	0	0	0	0	0
P13	0	0	0	0	0	0	0	0
P14	0	0	0	0	0	1	0	1
P17	0	0	0	0	0	0	0	0
P21	0	0	0	0	0	0	0	0
P27	0	0	2	0	0	0	0	2
P36	0	0	2	0	0	1	0	2
P37	0	0	1	0	0	0	0	1
N=11								
Média	0	0	0.73	0	0	0.18	0	0.82
Desvio								
Padrão			0.78			0.40		0.75

Anexo H - Histopatológico dos lobos isquêmicos do Grupo Salina

Rato	Tumefação	Retração	Esteatose	Necrose	Inflamação lobular	Inflamação portal	Celularidade Sinusoidal	Soma
P3	1	1	1	1	0	1	1	6
P5	1	1	1	0	0	0	0	3
P7	0	0	0	1	1	1	1	4
P9	0	0	0	1	1	1	1	4
P13	1	1	0	2	0	1	0	5
P14	0	0	0	0	0	0	0	3
P17	0	0	0	0	1	1	0	2
P21	0	0	1	2	0	0	0	3
P27	0	0	1	2	0	1	0	4
P36	0	0	0	1	0	0	0	1
P37	0	0	0	1	0	0	0	1
N=11								
Média	0.27	0.27	0.63	1.00	0.27	0.54	0.27	3.27
Desvio	0.46	0.46	0.92	0.77	0.46	0.52	0.46	1.55
Padrão								

Anexo I - Histopatológico dos lobos não isquêmicos do Grupo N2-Mercaptopropionilglicina

Rato	Tumefação	Retração	Esteatose	Necrose	Inflamação lobular	Inflamação portal	Celularidade Sinusoidal	Soma
P2	0	0	0	0	0	1	0	1
P4	0	0	1	0	0	1	0	2
P6	0	0	1	0	0	0	0	1
P8	0	0	1	0	0	1	0	2
P11	0	0	1	0	0	1	0	2
P16	0	0	0	0	0	1	0	1
P19	0	0	1	0	0	0	0	1
P20	0	0	1	0	0	0	0	1
P25	0	0	0	0	0	0	0	0
P34	0	0	0	0	0	0	0	0
P35	0	0	1	0	0	0	0	1
N=11								
Média	0	0	0.64	0	0	0.45	0	1.09
Desvio			0.50			0.52		0.7
Padrão								

Rato	Tumefação	Retração	Esteatose	Necrose	Inflamação	Inflamação	Celularidade	Soma
					lobular	portal	Sinusoidal	
P2	0	0	1	1	0	2	1	5
P4	1	1	0	2	0	1	1	6
P6	0	1	1	3	0	0	1	6
P8	0	0	0	2	1	1	1	5
P11	1	0	0	2	0	1	0	4
P16	1	1	0	2	0	1	0	5
P19	0	0	0	1	0	0	0	1
P20	0	1	0	0	0	0	0	1
P25	0	0	1	1	0	0	0	3
P34	0	0	0	2	0	0	0	2
P35	0	0	1	2	1	1	0	5
N=11								
Média	0.27	0.36	0.36	1.63	0.18	0.63	0.36	3.91
Desvio	0.46	0.50	0.50	0.81	0.40	0.67	0.50	1.87
Padrão								

8. REFERÊNCIAS

1. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003; V.74. Issue 2. P.86-93.
2. Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: H Sies. *Oxidative Stress*. San Diego. Academic Press.1985 P.1-7.
3. Lefer DJ, Granger N. Oxidative stress and cardiac disease. *The American Journal of Medicine*. 2000; V.109, Issue 4, P. 315-326.
4. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks - a review. *Liver Transpl*. 2010 Sep;16(9):1016-32.
5. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Naya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*. 2009 Jan-Feb;22(1):46-55.
6. Silva JR OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira FA, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão do pré condicionamento isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2002 17(3):93-100
7. Abdo EE; Cunha JEM, Deluca P, Coelho AM, Bacchella T, Machado MC. Protective effect of N2-Mercaptopropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process. *Gastroenterologia Experimental Rev Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, jul/set 2003;V40, n.3: 177-180.
8. McCORD J.M. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-63.

9. Takeuchi D, Yoshidome H, Kurosawa H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, *et al.* Interleukin-18 exacerbates pulmonary injury after hepatic ischemia/reperfusion in mice. *J Surg Res.* 2010 Jan;158(1):87-93.
10. Weinbroum AA, Kidron A, Hochhauser E, Hochman A, Rudick V, Vidne BA. Liver glutathione level in myocardial reperfusion injury following liver ischemia-reperfusion. *Med Sci Monit.* 2001 Nov-Dec;7(6):1137-44.
11. Behrends M, Hirose R, Park YH, Tan V, Dang K, Xu F, *et al.* Remote renal injury following partial hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Gastrointest Surg.* 2008 Mar;12(3):490-5.
12. Delva E, Camus Y, Norlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz R, *et al.* Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg.* 1989 Feb;209(2):211-8.
13. Gurusamy KS, Sheth H, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1): CD007632.
14. Mosca SM, Fantinelli JC, Arbelaes LFG, Perez IA. Protective effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine against ischemia–reperfusion injury in hypertrophied hearts em *Experimental and Molecular Pathology*, 2013; 94: 277-284.
15. Fontana C. Efeito do N2-Mercaptopropionylglyccine na sobrevivência de retalhos cutâneos submetidos à oclusão temporária do pedículo vascular. Estudo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1992.
16. Abdo EE, Sampietri SN, Coelho AM, Molan N, Kubrusly M. N2-Mercaptopropionylglycine(N2-MPG) in experimental acute pancreatitis. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1998;53:169-73.

17. Feldman A, Ketzer BM, Grabarz R, Aabuhab A, Gun C, Luca FA, *et al.* Análise da preservação do miocárdio após administração de N2-Mercaptopropioniglicina em modelo experimental de isquemia e reperfusão em cães. *Rev Med (São Paulo)*. 2004 jan-jun.; (1-2): 33-45.

18. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. **Institute o Laboratorial Animal Research**. Washington : National Academies Press, 2011. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

19. Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, Negishi K, *et al.* Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in a Rat Model. 2011.PLoS ONE 6(4): e19195. doi:10.1371/journal.pone.0019195

20. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg*. 2006;244(1):89-98.

21. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx>. Acesso em: 04/08/2016.

22. Procedimentos Operacionais Padronizados - Guia dos POPs de Resíduos de Serviços de Saúde. Disponível em: <http://www.bioterio.fm.usp.br/pdf/GuiadosPOPsResiduos.pdf>. Acesso em 04/08/2016.

23. Jancar S, De Giaccobi G, Mariano M, Mencia-Huerta JM, Sirois P, Braquet P. Immune complex induced pancreatitis: effect of BN 52021, a selective antagonist of platelet-activating factor. *Prostaglandins*. 1988;35(5):757-70

24. Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P *et al.* Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. 2002;17(4):286-92.
25. Quireze C, Montero EF, Leitão RM, 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. *J Invest Surg*. 2006; 19(4):229-36.
26. El-Missiry MA, Othman AI, Amer MA. Attenuation of the acute adriamycin-induced cardiac and hepatic oxidative toxicity by N2-(Mercaptopropionyl) Glycine in rats. *Free Radical Research*, 2001; 35: 575-581.
27. Erkut B, Onk, OA. Effect of N-acetylcysteine and allopurinol combination to protect spinal cord ischemia/reperfusion injury induced by aortic cross-clamping in rat model. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2015; 10:95, 1-9.
28. Xu YM, Ding GH, Huang J. Tanshinone IIA pretreatment attenuates ischemia/reperfusion-induced renal injury. *Experimental and therapeutic medicine* 2016 12: 2741-2746.
29. Vasquez ER, Cunha JE, Coelho AM, Sampietre SN, Patzina RA, Abdo E, *et al.* Trisulfate Disaccharide Decreases Calcium Overload and Protects Liver Injury Secondary to Liver Ischemia/Reperfusion. *PLoS One*. 2016 Feb 22;11(2):e0149630.
30. Miki T, Cohen MV, Downey JM. Failure of N2-mercaptpropionyl glycine to reduce myocardial infarction after 3 days of reperfusion in rabbits. *Basic Research in Cardiology*. 1999;94 (3), 180-187.

31. Canedo LF, Machado MA, Coelho AM, Sampietre SN, Bacchella T, Machado MC. Protective effects of an inhibitor of glycoprotein IIb/IIIa in hepatic and pulmonary disturbances secondary to ischemia and reperfusion injury of rat's liver. *Arq Gastroenterol*, 2007. 44(3):276-81.
32. Teixeira ARF, Molan NT, Privato MB, Coelho AM, Leite KR, Seguro AC, *et al*. Rosiglitazone-enriched diet did not protect liver ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Acta Cir Bras*, 2008. 23 (4): 378-383.
33. Teixeira ARF, Molan NT, Privato MB, Coelho AM, Leite KR, Seguro AC, *et al*. Postconditioning ameliorates lipid peroxidation in liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras*, 2009. 24 (1): 52-56.
34. Figueira ER, Bacchella T, Coelho AM, Sampietre SN, Molan NA, Leitão RM, *et al*. Timing-dependent protection of hypertonic saline solution administration in experimental liver ischemia/reperfusion injury. *Surgery*, 2010. 147(3): 415-23.
35. Andraus W, Souza GF, Oliveira MG, Haddad LB, Coelho AM, Galvão FH, *et al*. S-nitroso-N-acetylcysteine ameliorates ischemia-reperfusion injury in steatotic liver. *Clinics*. 2010. 65(7): 715-21.
36. Coelho AM, Machado MC, Takahashi HK, Sampietre SN, Stefano JT, Leite AZ, *et al*. Ischemic preconditioning-like effect of polyunsaturated fatty acid-rich diet on hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Gastrointest Surg*, 2011. 15(10):1679-88.
37. Sayão Filho RH, Perini MV, Cruz JA, Requena J, Barbeiro HV, Molan NT, *et al*. Superoxid dismutase activity in portal vein endothelium after partial liver resection. *Acta Cir Bras*, 2013. 28(9):646-51.

38. Nogueira MA, Coelho AM, Sampietre SN, Patzina RA, Silva FP, D'Albuquerque LA, *et al.* Beneficial effects of Adenosine Triphosphate-Sensitive K⁺ channel opener on liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*, 2014. 20 (41): 15319-26.
39. Figueira ER, Rocha-Filho JA, Nakatani M, Buto MF, Tatebe ER, Andre VO, *et al.* Hepatic ischemic preconditioning increases portal vein flow in experimental liver ischemia reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2014. 13(1):40-7.
40. Van Der Heijden KM, Van Der Heijden IM, Galvão FH, Lopes CG, Costa SF, Abdala E, *et al.* Intestinal translocation of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and ESBL-producing *Escherichia coli* in a rat model of bacterial colonization and liver ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*, 2014. 25;9(9):e108453.
41. Losada DM, Chies AB, Feres O, Chaib E, D'Albuquerque LA, Castro-e-Silva O. Effects of hyperbaric oxygen therapy as hepatic preconditioning in rats submitted to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras*, 2014 29 Suppl 2:61-6.
42. Cavalcante FP, Coelho AM, Machado MC, Sampietre SN, Patzina RA, Diniz MA, *et al.* Mechanisms of the beneficial effect of sevoflurane in liver ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2015. 30(11): 749-755.
43. Rocha-Santos V, Figueira ER, Rocha Filho JA, Coelho AM, Pinheiro RS, Bacchella T, *et al.* Pentoxifylline increases the protective effects of hypertonic saline solution in liver ischemia injury reperfusion through reduction of oxidative stress. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015. 14(2): 194-200.