

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Utilização da frutose-1,6-bisfosfato como um protetor
celular na preservação de fígados para transplante**

RAFAEL NOAL MORESCO

Orientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Dissertação de Mestrado

2003

M843u **Moresco, Rafael Noal**

Utilização da frutose-1,6-bisfosfato como um protetor celular na preservação de fígados para transplante / Rafael Noal Moresco ; orient. Jarbas Rodrigues de Oliveira. – 2003.

57 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Ciências Médicas. Porto Alegre – RS, 2003.

1. Fígado 2. Frutose-1,6-bisfosfatase 3. Frutose-bisfosfatase 4. Transplante de fígado 5. Preservação de órgãos I. Oliveira, Jarbas Rodrigues de II. Título.

NLM: WI 770

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

“Não existe verdadeira inteligência sem bondade.”

Bethoven

À minha amada mãe Regiani, pelo exemplo de ser humano e por me ensinar a superar as dificuldades e acreditar na beleza da realização dos sonhos.

Ao Marcos, pelo carinho paterno demonstrado nos últimos 19 anos.

Às minhas irmãs Raquel, Fernanda e Thuany, pelos momentos de alegria vivenciados ao longo de todos esses anos.

Aos meus avós, Catarina (*in memoriam*) e Felisberto (*in memoriam*), pelo apoio, carinho e amor dedicados a mim ao longo de suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, orientador desta pesquisa, pela confiança, amizade, dedicação e profissionalismo compartilhados durante a realização desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, pela oportunidade pessoal de aprimoramento científico dentro dos mais elevados padrões exigidos pelo curso.

À minha namorada Patrícia, pelo carinho, amor e companheirismo compartilhados ao longo dos últimos cinco anos de nossas vidas.

Aos amigos e colegas Roberto Christ Vianna Santos e José Carlos Farias Alves Filho pela dedicação, amizade e companheirismo demonstrados durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Biofísica da PUCRS, especialmente à: Aline da Cunha, Cristine dos Reis, Cássio Graziottin, Adroaldo Lunardelli, Márcio de Assis, Patrick Gastareto, Elisiane Lozza e Telmo Castaman.

Ao Prof. Dr. Paulo Harald Wächter, pela amizade e pelas sugestões apresentadas durante a realização deste.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Reichel, professor da Faculdade de Medicina da PUCRS e responsável pelo Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela atenção dispensada durante a realização da análise histológica apresentada neste estudo.

Ao Sr. Cláudio Rogério Oliveira, funcionário do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pelo processamento das amostras e confecção das lâminas utilizadas na análise microscópica.

Ao Dr. Carlos Franco Voegeli, chefe do Laboratório Central de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, pelo constante apoio e compreensão demonstrados ao longo deste trabalho.

Ao amigo e colega Luís Cláudio Rosa Vargas, pelo estímulo, incentivo, sabedoria e amizade demonstrados durante os momentos mais difíceis da realização deste estudo.

Ao amigo Alan Birck da Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP-ISCOMPA), pela orientação estatística prestada durante a realização deste trabalho.

Às secretárias Helena e Letícia e ao secretário Luciano do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela dedicação e competência demonstrados no exercício de suas funções neste Programa .

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina da UFRGS, especialmente à Helen Flores, pela atenção dispensada durante a elaboração da ficha catalográfica.

À Roche Diagnostics, pela generosa doação dos reagentes utilizados para a mensuração das atividades enzimáticas descritas nesta dissertação.

À Faculdade de Biociências da PUCRS, pela disponibilização do biotério e dos animais utilizados nesta pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DA LITERATURA.....	13
Considerações sobre transplantes e preservação de órgãos.....	13
Frutose-1,6-bisfosfato como protetor celular.....	17
OBJETIVOS.....	19
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	20
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS.....	25
Abstract.....	25
Introduction.....	26
Material and Methods.....	27
Results.....	29
Discussion.....	30
References.....	33
Figures.....	38
ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS.....	41
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Materiais e Métodos.....	44
Resultados.....	45
Discussão.....	46
Referências.....	50
Figuras.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

FBP: Frutose-1,6-bisfosfato

HES: Hidroxietilamido

ATP: Adenosina trifosfato

ROS: Espécies reativas do oxigênio

AST: Aspartato aminotransferase

ALT: Alanina aminotransferase

LDH: Lactato desidrogenase

TBARS: Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

UW: Solução de preservação da Universidade de Wisconsin

UWM: Solução de preservação de UW modificada contendo 10 mmol/L de FBP

FBPS: Solução de preservação de frutose contendo 10 mmol/L de FBP

HE: Hematoxilina-eosina

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Níveis de AST obtidos nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4°C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por *** $p < 0,001$ e entre os grupos UW e FBPS por # $p < 0,05$ 38 e 55
- FIGURA 2.** Níveis de ALT obtidos nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4°C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por *** $p < 0,001$ e entre os grupos UW e FBPS por ## $p < 0,01$ 38 e 55
- FIGURA 3.** Níveis de LDH obtidos nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4°C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e entre os grupos UW e FBPS por ## $p < 0,01$ 39 e 56
- FIGURA 4.** Concentrações de TBARS obtidas nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4 °C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e entre os grupos UW e FBPS por ### $p < 0,001$ 39 e 56

FIGURA 5. Micrografia (HE 200 x) de fígado perfundido com solução de UW a 4°C no tempo de 0 hora. Hepatócitos apresentando seus limites e características celulares preservadas..... 40 e 57

FIGURA 6. Micrografia (HE 200 x) de fígado perfundido com solução de UW e preservado a 4°C por 24 horas. Visualização de hepatócitos apresentando rompimento dos limites celulares com presença de um moderado grau de citólise (*setas*)..... 40 e 57

INTRODUÇÃO

O transplante hepático é provavelmente o maior desafio clínico-cirúrgico das últimas décadas, sendo hoje mundialmente aceito como tratamento de escolha para doenças hepáticas terminais. O avanço no conhecimento e o domínio da cirurgia hepática aliado ao uso de soluções para preservação de órgãos e de drogas imunossupressoras mais potentes vêm permitindo a obtenção de ótimos resultados nesse procedimento. Atualmente, várias dificuldades que outrora impediam a evolução favorável dos pacientes transplantados já foram superadas.[1][2][3]

O desenvolvimento dos transplantes e sua aplicação no tratamento das doenças terminais de alguns órgãos converteram-se num dos capítulos de maior êxito na história da medicina e, em aproximadamente três décadas, o transplante de órgãos evoluiu de um procedimento relativamente arriscado, realizado apenas em pacientes com doença renal crônica em estágio final, para uma intervenção terapêutica eficaz em pacientes com doenças terminais do coração, fígado e pulmão.[4] Estima-se que anualmente, em todo o mundo, em torno de 500 mil pacientes desenvolvam insuficiência renal crônica, 300 mil insuficiência cardíaca e 200 mil insuficiência hepática, provocando uma demanda, apenas destes órgãos, de um milhão de transplantes por ano.[5]

O crescente aumento do número de transplantes desencadeado pelo avanço das técnicas e terapias utilizadas, aliado à conscientização da população quanto à importância da doação de órgãos, vem fazendo com que o Brasil, em especial o Estado do Rio Grande do Sul, apareçam no cenário mundial como um dos mais respeitados centros de transplante. Entretanto, o aumento do número de transplantes está diretamente associado à elevação dos custos de saúde no Brasil. Dentre os itens que promovem este aumento estão as soluções utilizadas para a preservação de órgãos, em especial a solução desenvolvida na Universidade de Wisconsin (UW), que é utilizada principalmente para a perfusão e preservação do fígado. São gastos em

média cinco litros desta solução a cada transplante, sendo que cada litro custa aproximadamente 350 dólares.

O elevado custo envolvendo a preservação de fígados para transplante e o seu impacto sobre o sistema de saúde são fatores que destacam a importância de pesquisas em busca de substâncias que possam vir a ser utilizadas para este fim. Além disso, alguns autores relatam que a evolução do transplante hepático depende mais propriamente dos progressos nos métodos de preservação de órgãos do que das técnicas cirúrgicas e de imunossupressão.[6][7]

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é uma substância com baixa toxicidade que vem sendo estudada há algum tempo e vem apresentando bons resultados como protetor celular em diversas situações, incluindo nas lesões induzidas em fígados por agentes químicos como a galactosamina [8] e também nos danos envolvidos na isquemia e reperfusão de fígados.[9] Nosso grupo tem relatado recentemente que a FBP também apresenta efeitos benéficos nos casos de septicemia, provocando uma diminuição do índice de mortalidade nos ratos com septicemia induzida tratados com FBP.[10][11] Outro estudo desenvolvido por nosso grupo demonstrou que a FBP apresentou eficácia na preservação de rins, podendo ser um importante constituinte de novas soluções de preservação que a utilizem em sua formulação.[12]

No presente estudo, delineou-se um modelo experimental em que foi realizada a perfusão e a retirada dos fígados de ratos utilizados para a avaliação do grau de preservação dos órgãos. Os órgãos foram preservados por um período de até 24 horas em soluções que continham FBP em sua formulação, sendo que estes foram comparados a um grupo de referência em que foi utilizada a solução de UW, que é considerada o padrão para a preservação de fígados. Objetivou-se avaliar o grau de preservação dos fígados através da mensuração de parâmetros bioquímicos indicadores de lesão e posterior avaliação histológica dos órgãos.

REVISÃO DA LITERATURA

Considerações sobre transplantes e preservação de órgãos

Os estudos sobre a preservação de órgãos para transplantes tiveram um grande avanço com os estudos do metabolismo sob condições de hipotermia realizados por Levy em 1959, aos quais provaram que estas condições são de grande valia na redução do consumo de oxigênio. Estes estudos avaliaram as temperaturas de 10 e 20° C e constataram haver uma redução entre 84 e 95 % na taxa de consumo de oxigênio pelas células. O estudo possibilitou determinar que 30 minutos de isquemia quente são mais prejudiciais ao metabolismo do órgão do que 30 horas de isquemia fria (4° C) na preservação de órgãos para transplante. Esta descoberta provocou o início das perfusões realizadas com soluções frias a 4° C.[13]

A história da preservação de fígados para transplante iniciou nos anos 50 com a introdução do princípio da hipotermia na preservação de órgãos. Nos anos 60, Schalm *et al.* introduziram uma solução fria para preservação baseada na composição do plasma e eles conseguiram preservar fígados por um tempo superior a 4 horas.[14] Em 1969, Collins *et al.* descreveram uma solução fria para preservação de rins e esta solução deu origem a outros derivados, sendo que um deles, a solução de Eurocollins, ainda é utilizada na preservação de alguns órgãos.[15][16] Nos anos 70, Wall *et al.* introduziram uma solução contendo frações de proteínas plasmáticas e também obtiveram um tempo de preservação para fígados de 4 horas.[17]

A introdução da solução de preservação da Universidade de Wisconsin (UW) em 1988 provocou profundas mudanças nos procedimentos para transplante de fígado.[18][19] Com a sua descoberta, o tempo de isquemia fria foi prolongado para até 24 horas, conferindo maior segurança e ao mesmo tempo tranqüilidade para o transporte e implante do órgão em operação sabidamente prolongada e laboriosa. A

solução UW apresenta altas concentrações de potássio, tampão fosfato, colóides, inibidores metabólicos, quelantes de radicais livres e hormônios estabilizadores de membrana.[2] [20]

A solução de UW introduziu três novas filosofias: (a) a concentração osmótica é mantida com substratos metabolicamente inertes como lactobionato; (b) a administração adicional do colóide transportador hidroxietilamido (HES); (c) a adição de substâncias capazes de proteger as células da ação dos radicais livres, incluindo glutathione e alopurinol.[2] A solução de UW é considerada a solução padrão para preservação de fígados, rins e pâncreas.[2] [21] Os motivos pelos quais essa solução apresenta excelente qualidade de preservação ainda não são totalmente claros, porém estes resultados podem ser atribuídos principalmente à presença de precursores de adenosina trifosfato (ATP) e antioxidantes.[21][22]

A chave para o sucesso da preservação de órgãos é a hipotermia, uma vez que ela provoca uma diminuição no grau de degradação dos componentes celulares essenciais para a viabilidade do órgão. A hipotermia não paralisa o metabolismo; ela simplesmente diminui a velocidade das reações enzimáticas e da morte celular. Uma segunda consideração importante para o sucesso de uma solução fria de preservação é a prevenção da acidose intracelular. A acidose tecidual pode lesar células e induzir a instabilidade lisossomal, ativando enzimas lisossômicas e alterando as propriedades mitocondriais.[1]

Outra consideração importante para a eficácia de uma solução fria de preservação é a capacidade de proteger o órgão de injúrias provocadas por espécies reativas do oxigênio (ROS) durante a isquemia e reperfusão.[1] [23][24] A produção de ROS e a resultante peroxidação lipídica tem sido observada em preparações microsossomais hepáticas durante o metabolismo da ciclosporina A e tacrolimus.[25] Uma consideração final importante diz respeito ao metabolismo energético. O ATP é rapidamente degradado durante o armazenamento em hipotermia e esta degradação resulta na formação de produtos finais que são permeáveis à membrana plasmática. A

reperfusão do órgão necessita de uma rápida regeneração da atividade da bomba de Na^+ , bem como outros processos que requerem ATP para o seu funcionamento. A viabilidade dos precursores de ATP pode ser importante para o sucesso da preservação de órgãos.[1]

Um sério problema a ser enfrentado durante o transplante hepático se refere às injúrias ocorridas durante o período da isquemia e reperfusão.[26][27] Os mecanismos envolvidos no desencadeamento desses danos são multifatoriais e ainda não foram completamente esclarecidos a nível celular.[28][29] Diminuição dos níveis de ATP, distúrbios na homeostasia do cálcio intracelular e da ativação da fosfolipase A_2 foram descritos como os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na perda da viabilidade celular durante a isquemia.[9] [27] [29][30]

Durante a isquemia ocorre uma progressiva degradação de adenosina trifosfato (ATP), causando um grande acúmulo de catabólitos de purinas. Sabe-se que a adenosina, um dos produtos intermediários da cascata de degradação, exerce várias ações biológicas, tais como: aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação, inibição da produção de radicais livres, supressão na atividade dos neutrófilos e inibição da agregação plaquetária. Com a reoxigenação, a adenosina torna-se um importante substrato para a nova síntese do ATP.[31]

O processo de isquemia a frio vem sendo usado com relativo sucesso há vários anos nos transplantes hepáticos, já que o frio reduz os processos metabólicos devido a alterações nas reações enzimáticas, mantendo as membranas mais estáveis e a integridade celular.[1] Atualmente várias técnicas de perfusão estão sendo usadas para prevenir os danos causados pela isquemia, porém, o tempo total de isquemia, as dificuldades inerentes às técnicas de resfriamento e as soluções de preservação utilizadas ainda podem ser otimizadas.[32][33]

Um dos grandes desafios na área de pesquisa médica que envolve o transplante hepático diz respeito à identificação e mensuração do grau de lesão celular e vascular que ocorre no fígado durante o período de isquemia. Os mecanismos de

lesão ainda não estão bem esclarecidos, mas diversos fatores têm sido descritos na literatura.[24] [29] Vários estudos realizados estão relacionando a extensão de lesão hepatocitária após a isquemia fria, determinada pela dosagem de enzimas hepáticas no líquido de preservação perfundido no órgão, com a evolução dos pacientes no pós-operatório imediato, sugerindo a existência de relação entre o grau de lesão de preservação e o desenvolvimento de disfunção primária do órgão.[34][35]

Lange *et al.* avaliaram 50 fígados humanos retirados para transplante e determinaram o grau de lesão celular isquêmica através das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH), medidas na solução de preservação de UW logo após perfusão do órgão. Os resultados foram comparados com a evolução clínica dos pacientes e o grupo observou uma associação entre os níveis enzimáticos e a evolução dos pacientes. A determinação da atividade das enzimas hepáticas no líquido de preservação pode evidenciar a lesão celular sofrida no período de isquemia fria e, com isto, determinar fator prognóstico para funcionamento do órgão e viabilidade do mesmo para transplante.[34] A liberação das enzimas AST, ALT e LDH na solução de preservação é um importante índice para avaliar a qualidade da preservação do órgão [36], sendo um sensível marcador de danos pré-existentes ou adquiridos durante o período de isquemia.[34]

As enzimas AST e ALT são encontradas predominantemente no fígado e o aumento de suas atividades está diretamente associado a lesões hepato-celulares. A atividade da enzima ALT é mais elevada do que a da AST na maior parte das doenças hepáticas, exceto nos casos de hepatite alcoólica e síndrome de Reye.[37] A enzima LDH é encontrada no coração, músculo esquelético, eritrócitos, pulmões, tecido linfóide, rim e fígado. A elevação de seus níveis está associada a danos celulares, embora ela não possua a mesma especificidade que as enzimas AST e ALT possuem para indicar danos hepato-celulares.[38][39] As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) são responsáveis por parte dos danos ocorridos ao órgão

durante a preservação e a reperfusão. A elevação de seus níveis está associada a um aumento da peroxidação lipídica e conseqüente dano celular.[40]

Os recentes avanços no manejo imunológico, nas técnicas cirúrgicas, nos cuidados intensivos, além da introdução de drogas imunossupressoras mais modernas e de soluções de preservação mais eficientes, vieram a contribuir para melhorar os resultados dos transplantes.[4] As indicações para transplante de órgãos sólidos estão se tornando cada vez mais liberais, aceitando-se pacientes idosos ou com doenças sistêmicas associadas, levando a uma expansão no número de potenciais receptores.[5] Atualmente, o transplante hepático, além de ser o procedimento recomendado para o tratamento de doenças hepáticas terminais, também tem apresentado excelentes resultados em distúrbios como alguns erros inatos do metabolismo.[3] Entretanto, a evolução do transplante hepático depende mais propriamente dos progressos nos métodos de preservação de órgãos do que das técnicas cirúrgicas e de imunossupressão.[6][7]

Frutose-1,6-bisfosfato como protetor celular

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um intermediário altamente energético da glicólise, tem sido objeto de vários estudos, sendo que alguns destes atribuem a ela uma atividade protetora das células hepáticas contra a ação de hepatotoxinas como a galactosamina.[8] [41][42] A FBP também apresenta efeito protetor contra danos induzidos por algumas drogas, incluindo as injúrias provocadas pelo paracetamol [43] e a peroxidação lipídica induzida pela anfotericina B.[44] Alguns autores relataram que a FBP apresenta efeito protetor sobre o cérebro [45] e também sobre o coração.[46]

Alguns estudos têm demonstrado que a FBP apresenta um efeito protetor do fígado contra danos ocorridos durante a isquemia e reperfusão.[9] [23] Além disso, nosso grupo de pesquisa verificou que a FBP é eficaz também na preservação de rins de ratos.[12] Outros estudos recentemente desenvolvidos pelo nosso grupo

demonstraram que a FBP reduz o índice de mortalidade em sepse induzida experimentalmente em ratos [10][11] e também reduz os índices de necrose, provocando um aumento nos índices de apoptose em fígados de ratos [47], além de apresentar efeito imunomodulatório na proliferação de linfócitos T.[48]

Os efeitos da FBP têm sido atribuídos principalmente a: (a) sua capacidade de aumentar o metabolismo dos carboidratos por intervenção na rota glicolítica, não somente como um regulador metabólico mas também como um substrato; (b) redução da demanda energética e um conseqüente aumento da eficiência metabólica; (c) estabilização das membranas celulares.[42]

Os estudos com a frutose 1,6-bisfosfato demonstram que, por se tratar de uma substância oriunda da degradação fisiológica da glicose, ela apresenta baixa toxicidade e pode ser um importante constituinte de novas formulações de soluções de preservação de órgãos para transplante.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito da frutose-1,6-bisfosfato na preservação de fígados para transplante.

Específicos

Determinar o aparecimento de enzimas indicadoras de lesão hepática nas diferentes soluções de preservação utilizadas nos grupos experimentais;

Investigar o papel das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) na preservação de fígados e o potencial da FBP em suprimir os danos causados pelos radicais livres;

Avaliar as alterações histológicas ocorridas nos fígados preservados para transplante por 24 horas.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; **45**: 673-76.
2. Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 2069-70.
3. Klempnauer J, Schrem H, Becker T, *et al.* Liver transplantation today. *Transplant Proc* 2002; **33**: 3433-35.
4. Garcia VD. *Por uma política de transplantes no Brasil*. São Paulo: Office Editora, 2000.
5. Garcia VD, Abrahão MRC, Hoefelmann N. Procura de órgãos. In: Neumann J, Abbud Filho M, Garcia VD, eds. *Transplante de Órgãos e Tecidos*. São Paulo: Sarvier 1997: 91-102.
6. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, *et al.* Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 1988; **46**: 517-22.
7. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; **74**: 779-83.
8. Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, *et al.* Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992; **15**: 1147-53.
9. Sano W, Watanabe F, Tamai H, *et al.* Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1785-92.
10. Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCF, *et al.* Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; **30**: 2069-74.

11. Nunes FB, Lunardelli A, Grazziotin C, *et al.* An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; **47**: 35-41.
12. Wächter PH. Efeito da frutose-1,6-bisfosfato na preservação de rins de ratos [Tese]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 1998.
13. Goligorsky MS. *Acute renal failure: new concepts and therapeutic strategies*. New York: Churchill Livingstone, 1995.
14. Schalm SW, Terpstra JL, Drayer B, *et al.* A simple method for short-term preservation of a liver homograft. *Transplantation* 1969; **8**: 877-81.
15. Collins GM, Bravo-Sugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation: initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 1969; **2**: 1219-22.
16. Dreikorn K, Horsch R, Rohl L. 48 to 96 hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins solution. *Eur Urol* 1980; **6**: 221-24.
17. Wall WJ, Calne RY, Herbertson BM, *et al.* Simple hypothermic preservation for transporting human livers long distances for transplantation. *Transplantation* 1977; **23**: 210-16.
18. García-Valdecasas JC, González FJ, Grande L, *et al.* Study of liver preservation: the use of University of Wisconsin or Euro-Collins solutions alone or in a combined method. *Transplant Proc* 1991; **23**: 2453-55.
19. Pokorny H, Grünberger T, Rockenschaub S, *et al.* Preservation of the liver: is it possible to extend the time of storage? *Transplant Proc* 1999; **31**: 2074-76.
20. Lange R, Erhard J, Rauen U, *et al.* Hepatocellular injury during preservation of human livers with UW and HTK solution. *Transplant Proc* 1997; **29**: 400-02.
21. Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, *et al.* Important components of the UW solution. *Transplantation* 1990; **49**: 251-57.
22. Boudjema K, Ellero B, Barguil Y, *et al.* Addition of reduced glutathione to UW solution: clinical impact in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; **23**: 2341-43.

23. Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1992; **16**: 325-39.
24. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, *et al.* Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ase activity in the perfused rat liver after cold preservation. *Transplant Proc* 1997; **29**: 1328-30.
25. Elinav H, Kohen R, Granot E. Plasma oxidizability and plasma carbonyls, markers of oxidative stress, in liver transplant patients. *Transplant Proc* 2001; **33**: 2918-19.
26. Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002; **34**: 2659-61.
27. Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, *et al.* Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; **386**: 31-37.
28. Peralta C, Rull R, Rimola A, *et al.* Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; **71**: 529-36.
29. Kim JS, Southard JH. Effect of liver preservation on hepatocyte calcium and ATP regeneration. *Transplant Proc* 1997; **29**: 3447-48.
30. Michel P, Ferrera R. Importance of calcium during hypothermic myocardial preservation with standard and modified UW solutions. *Transplant Proc* 2002; **34**: 1118-20.
31. Todo S, Zhu Y, Zhang S, *et al.* Attenuation of ischemic liver injury by augmentation of endogenous adenosine. *Transplantation* 1997; **63**: 217-23.
32. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; **312**: 159-63.
33. Busuttil RW, Klintmalm GB. *Transplantation of the liver*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996.

34. Lange R, Erhard J, Rauhen U, *et al.* Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; **62**: 1255-59.
35. Karayalcin K, Harrison JD, Attard A, *et al.* Can effluent hyaluronic acid or creatine kinase predict sinusoidal injury severity after cold ischemia? *Transplantation* 1993; **56**: 1336-39.
36. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, *et al.* An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; **46**: 512-16.
37. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, *et al.* Diagnosis and monitoring of hepatic injury I: performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000; **46**: 2027-49.
38. Ravel R. *Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
39. Adolpho L, Lorenz R. *Diagnóstico enzimático das doenças do coração, fígado e pâncreas*. São Paulo: Atheneu, 1981.
40. Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1992; **16**: 325-39.
41. Markov AK, Farias LA, Bennet WS, *et al.* Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate. *Pharmacology* 1991; **43**: 310-17.
42. Roig T, Oliveira JR, Bartrons R, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994; **266**: C1722-28.
43. Martin FL, McLean AEM. Comparison of protection by fructose against paracetamol injury with protection by glucose and fructose-1,6-diphosphate. *Toxicology* 1996; **108**: 175-84.
44. Rao MR, Olinde KD, Markov AK. Protection from amphotericin B-induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; **95**: 217-20.

45. Espanol MT, Litt L, Hasegawa K, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. *Anesthesiology* 1998; **88**: 461-72.
46. Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, *et al.* Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1990; **10**: 167-76.
47. Aiub CAF, Bortolini R, Azambuja AA, *et al.* Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2002; *in press*.
48. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JCF, *et al.* Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *Int Immunopharmacology* 2003; *in press*.

USE OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE IN COLD STORAGE SOLUTION FOR LIVER PRESERVATION

ABSTRACT: University of Wisconsin (UW) solution is considered the standard preservation solution for livers, kidneys and pancreas. Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) has been reported to have a protective effect in liver injury caused by chemical agents and ischemic-reperfusion damages. The aim of this study was to evaluate the effects of FBP in storage solution for cold liver preservation. In this experimental study, we divided the rats in three experimental groups. The perfusion and preservation of the liver were performed on each group with UW, UW containing 10 mmol/L of FBP (UWM) and FBP 10mmol/L (FBPS) solutions, respectively. The livers were stored in a plastic bag containing storage solution at 4°C for 24 hours. Biochemical measurements of AST, ALT, LDH e TBARS were realized in cold storage solution samples at 0, 12, 18 and 24 hours of preservation. Histological evaluation was performed in tissue samples obtained after 24 hours of cold storage. The preservation grade was similar in FBPS and UW solutions during 18 hours. Addition of 10 mmol/L of FBP in UW solution induced liver injury and a poor preservation when compared to group of livers preserved in UW solution. FBP protects the liver from injury caused by free radicals for preservation times below 18 hours. There were no significant histological differences between groups after 24 hours of preservation. FBP could be an important component of cold storage solutions for liver preservation

KEYWORDS: fructose-1,6-bisphosphate, liver, cold preservation.

INTRODUCTION

History of liver preservation starts in the 1950s when the principle of hypothermia for organ preservation was detected. Schalm *et al.* introduced a plasma-based cold storage solution in the 1960s and they reached preservation times for liver up to 4 hours.[1] In 1969, Collins *et al.* described a cold storage solution for kidney preservation and this solution, or one of its derivatives such as Eurocollins, is still used for preservation of solid organs.[2][3] In 1970s, Wall *et al.* introduced a plasma protein fraction solution and they obtained a human liver preservation for 4 hours.[4]

The introduction of the University of Wisconsin (UW) solution in 1988 influenced profound changes in the procedures for liver transplantation.[5][6] The UW solution is considered the standard preservation solution for livers, kidneys and pancreas.[7][8] The reasons why this solution gives excellent quality and relatively long-term preservation are not entirely clear but these results could be attributed to the presence of ATP precursors and antioxidants.[8][9]

With the introduction of improved immunosuppressive and surgical techniques, liver transplantation has become an increasingly common and successful modality for the treatment of end-stage liver disease.[10][11][12] However, the evolution of liver transplantation depends on progress in methods of organ preservation rather than in immunosuppression or surgical techniques.[12][13]

Important features for successful cold storage solution include: hypothermia; prevention of intracellular acidosis because tissue acidosis can damage cells and activate lysosomal enzymes; the capacity to protect the organ from injury caused by reactive oxygen species (ROS) during ischemia/reperfusion and the capacity to maintain cell energy metabolism. [14][15][16] Depletion of ATP, disturbance of intracellular calcium homeostasis and phospholipase A₂ activation were suggested as major pathophysiological mechanisms during ischemia leading to the loss of cell viability.[17][18][19][20] Measurement of enzyme activities in the effluent of the

preserved organ at the end of cold ischemia might provide data that are valuable in the assessment of graft quality prior to transplantation.[21] Enzyme release of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) is an important index of quality of preservation.[22]

Fructose is a well-known glycolytic substrate that protects the cells when ATP synthesis is compromised.[23] Fructose-1,6-bisphosphate (FBP), a high energy intermediate of glycolysis, has been reported to have a protective effect in liver injury caused by chemical agents, as galactosamine [24], and ischemic-reperfusion damages.[15] [19] The effects of FBP have been mainly attributed to: (a) its ability to enhance carbohydrate metabolism by intervening in the glycolytic pathway, not only as a metabolic regulator but also as a substrate; (b) a reduction in the energy demand and therefore an increase in metabolic efficiency; (c) a stabilization of cell membranes, nonspecifically influencing different ionic channels and enhancing membrane fluidity.[25] Recently our group reported that FBP reduces the mortality rate in experimental sepsis induced in rats [26][27] and reduces necrosis and increases apoptosis rate in the liver of rats.[28] The aim of this study was to evaluate the effects of FBP in the composition of storage solutions for cold liver preservation.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult male Wistar rats weighing 200-300 g were used in this experimental study. Rats were fed *ad libitum* and deprived of food for 12 hours before the experiments. Each rat was anesthetized by the intraperitoneal administration of sodium thiopental (50 mg/kg body weight). Rats were divided in three experimental groups. The experimental protocol was approved by the Ethics Research Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS).

Experimental protocol

Perfusion and preservation of the liver were realized with different solutions in each group. The solutions used in the present study were UW solution (n=10)(DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE), UW solution containing 10 mmol/L of FBP (UWM, n=7) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and FBP solution (FBPS, n=7) containing 10 mmol/L of FBP dissolved in 0.9% NaCl. The osmolarity of solutions was 320, 350 and 330 mOsm/L, respectively.

Surgical method was performed according Schalm *et al.*[1] The portal vein was cannulated and the livers were flushed *in situ* with cold preservation solution (4°C) at a constant perfusion pressure of 60 cm of H₂O and then stored in a plastic bag containing 60 mL of the same solution on ice (4°C) for 24 hours. Samples from these cold storage solutions were taken at 0, 12, 18 and 24 hours to biochemical measurements of AST, ALT, LDH and thiobarbituric acid reactive species (TBARS).

Enzymes activity measurement of AST, ALT and LDH was performed in Cobas Integra 700 analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using reagents from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) according standard methods.[29][30][31] Measurement of TBARS is a important parameter to evaluate the lipid peroxidation induced by oxygen free radicals.[32][33][34] TBARS concentration was determined in the cold storage samples from experimental groups using a colorimetric reaction with thiobarbituric acid.[33] Tissue samples from livers were used before 24 hours ice cold for histological evaluation. Liver specimens were stained with hematoxylin-eosin (HE). Histological scores were created for evaluation according citolysis grade (1: absence of citolysis; 2: discrete citolysis; 3: moderate citolysis and 4: severe citolysis).

Statistics

Enzymes and TBARS values were expressed as mean \pm standard error. Statistical analysis from enzymes and TBARS was performed according to Mann-

Whitney test. Chi-square test was used for statistical analysis in the histological evaluation. A p value lower than 0.05 was considered significant.

RESULTS

After 12, 18 and 24 hours of preservation, AST release in the UWM group was significantly higher than AST release in the UW group ($p < 0.001$, Fig. 1). However, AST release in the FBPS was lower than AST release in the UW group after 12 hours of preservation ($p < 0.05$, Fig. 1). There were not significant differences after 18 and 24 hours of preservation. After 12, 18 and 24 hours of preservation, ALT release in the UWM group was significantly higher than ALT release in the UW group ($p < 0.001$, Fig. 2). After 24 hours, ALT release in the FBPS were higher than ALT release in the UW group ($p < 0.01$, Fig. 2), but there were not significant differences after 12 and 18 hours of preservation.

LDH release in the UWM group was significantly higher than LDH release in the UW group after 12, 18 and 24 hours of preservation ($p < 0.05$, Fig. 3). However, LDH release in the FBPS was lower than LDH release in the UW group after 12, 18 and 24 hours of preservation ($p < 0.01$, Fig. 3). TBARS values were lower in the FBPS and UWM groups after 12 and 18 hours of preservation compared to UW group ($p < 0.01$, Fig. 4), but there were not significant differences between groups after 24 hours.

The histological evaluation of livers preserved for 24 hours demonstrated discrete and moderate cytolysis preponderating scores 2 and 3 in the livers preserved in UW, UWM and FBPS cold storage solutions. However, there were no significant histological differences between UW, UWM and FBPS groups after 24 hours of preservation. Figures 5 and 6 show histological aspect of the livers at 0 and 24 hours after cold preservation.

DISCUSSION

Liver transplantation has been accepted as the treatment for end-stage liver disease because of improving success rates with the development and refinement of operative techniques, immunosuppressive treatment and preservation.[13] FBP, a high-energy intermediate of glycolysis, has been demonstrated a protective effect in toxic liver injury [24][28][35], in injury induced by drugs as paracetamol [36] and anphotericin B [37], in experimental sepsis [26][27] and others organs as heart [38] and brain.[39] FBP is therapeutically effective against ischemia-reperfusion injury on the liver. [15][19][40] The mechanism responsible for the effects of FBP is still uncertain, but some authors [19][24][40][41] have suggested that this bisphosphorylated sugar crosses the cell membranes and restores the depressed glycolytic activity, intervening in the glycolytic pathway not only as a metabolic regulator but also as a substrate. Other possible explanation could be that FBP interacted with cell membranes, modifying the ion permeability.[24]

FBP concentration used in this study (10 mmol/L) was the same suggested for Hirokawa *et al.*[13] e Sano *et al.*[19]. The AST and LDH enzymes release in FBP solution were lower than AST and LDH release observed in UW solution at 24 hours of preservation, while ALT release was higher than only at 24 hours of preservation. These results indicated that the preservation grade was similar in FBP and UW solutions during 18 hours. The AST, ALT and LDH enzymes release in UWM solution was higher than enzymes release observed in UW solution during 24 hours of preservation. The addition of 10 mmol/L of FBP in UW solution induced liver injury and a poor preservation when compared to group of livers preserved in UW solution.

The similar preservation results obtained with FBPS and UW solutions could be attributed to protective effects of FBP against liver injury. There is a decrease of intracellular ATP levels during cell death. Moreover, there are alterations in the membrane permeability and ion flux, occurring an increase of intracellular Ca^{2+} levels.

FBP solution was effective to preserve livers in this study. FBP interacts with the biomembrane and maintains cell viability via membrane stabilization. FBP maintains the intracellular ATP level by activating the glycolytic pathway.[19][24][25][36] These functions are important to maintain cellular viability during liver storage.[13] FBP has a chelate action on Ca^{2+} and modulates intracellular Ca^{2+} homeostasis. Hirokawa *et al.* demonstrated that FBP inhibited the rise of intracellular Ca^{2+} concentration in isolated rat Kupffer cells.[13]

Lipid peroxidation analysis demonstrated that TBARS concentrations in the livers preserved with FBP and UWM solutions were lower than TBARS concentration in UW group for 18 hours of cold preservation. There were no differences between groups in TBARS concentrations when the livers were preserved for 24 hours. FBP protects the liver from injury caused by free radicals for preservation times below 18 hours. These results indicate that FBP can suppress the lipid peroxidation chain reaction induced by free radicals.

Some authors demonstrated that FBP is able to suppress the oxygen free radical generation [13] and the lipid peroxidation.[19][38] Tavazzi *et al.* [38] reported that the lipid peroxidation level in rat hearts increased significantly during reoxygenation and that this increase was completely suppressed by FBP administration. They also observed the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, a process that is accepted to be as a major source of superoxide anion, in the heart during ischemia and found that this conversion was inhibited by FBP.[38]

Peralta *et al.* described the absence of correlation between oxidative stress and the degree of hepatic injury observed in their study does not support the hypothesis that oxidative stress is a major factor directly responsible of the damage induced by experimental hepatic ischemia-reperfusion.[42] This suggestion has also been raised by Brass *et al.*[43] Our findings also demonstrated absence of association between enzymes release and TBARS concentration.

The liver preservation grade in UWM solution was poor than the preservation observed in the UW and FBP solutions. UW solution presents a complex formulation. FBP could be interact with any formulation component and caused an inactivation. Hirokawa *et al.* added 10 mmol/L of FBP in UW solution and they controlled the secretion of cytokines and NO from Kupffer cells, however, they removed glutathione, adenosine, allopurinol and hydroxyethylstarch from UW solution and added 10 mmol/L of FBP in this solution.[13] In the UWM solution, we added 10 mmol/L of FBP and did not remove the glutathione, adenosine, allopurinol and hydroxyethylstarch from original UW solution. Histological findings of preserved livers with UW, UWM and FBPS were not significantly different at 24 hours of cold preservation. The sensitivity of the measurement of enzymes activity levels in cold storage solution is higher than the prediction based on morphology.[21]

The cold storage solution containing 10 mmol/L of FBP (FBPS) protects the liver during cold preservation. The preservation grade observed in FBPS was similar or better than preservation grade performed in UW solution. However, the preservation in UWM solution containing 10 mmol/L of FBP was poor than the preservation observed in UW and FBP solutions. Considering the elevated coast of UW solution, FBP could be an important component of others solutions for liver preservation in the future. However, our findings require confirmation in human hepatic transplant model.

REFERENCES

1. Schalm SW, Terpstra JL, Drayer B, *et al.* A simple method for short-term preservation of a liver homograft. *Transplantation* 1969; **8**: 877-81.
2. Collins GM, Bravo-Sugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation: initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 1969; **2**: 1219-22.
3. Dreikorn K, Horsch R, Rohl L. 48 to 96 hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins solution. *Eur Urol* 1980; **6**: 221-24.
4. Wall WJ, Calne RY, Herbertson BM, *et al.* Simple hypothermic preservation for transporting human livers long distances for transplantation. *Transplantation* 1977; **23**: 210-16.
5. Pokorny H, Grünberger T, Rockenschaub S, *et al.* Preservation of the liver: is it possible to extend the time of storage? *Transplant Proc* 1999; **31**: 2074-76.
6. García-Valdecasas JC, González FJ, Grande L, *et al.* Study of liver preservation: the use of University of Wisconsin or Euro-Collins solutions alone or in a combined method. *Transplant Proc* 1991; **23**: 2453-55.
7. Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 2069-70.
8. Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, *et al.* Important components of the UW solution. *Transplantation* 1990; **49**: 251-57.
9. Boudjema K, Ellero B, Barguil Y, *et al.* Addition of reduced glutathione to UW solution: clinical impact in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; **23**: 2341-43.
10. Klempnauer J, Schrem H, Becker T, *et al.* Liver transplantation today. *Transplant Proc* 2002; **33**: 3433-35.
11. Brass CA, Crawford JM, Narciso JP, *et al.* Evaluation of University of Wisconsin cold-storage solution in warm hypoxic perfusion of rat liver: the addition of fructose reduces injury. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1455-63.

12. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, *et al.* Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 1988; **46**: 517-22.
13. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; **74**: 779-83.
14. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; **45**: 673-76.
15. Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1992; **16**: 325-39.
16. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, *et al.* Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ase activity in the perfused rat liver after cold preservation. *Transplant Proc* 1997; **29**: 1328-30.
17. Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, *et al.* Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; **386**: 31-37.
18. Kim JS, Southard JH. Effect of liver preservation on hepatocyte calcium and ATP regeneration. *Transplant Proc* 1997; **29**: 3447-48.
19. Sano W, Watanabe F, Tamai H, *et al.* Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1785-92.
20. Michel P, Ferrera R. Importance of calcium during hypothermic myocardial preservation with standard and modified UW solutions. *Transplant Proc* 2002; **34**: 1118-20.
21. Lange R, Erhard J, Rauen U, *et al.* Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; **62**: 1255-59.

22. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, *et al.* An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; **46**: 512-16.
23. Yu CH, Leng XS, Peng JR, *et al.* Fructose protects rat hepatocytes against hypoxic injury during the process of isolation and microencapsulation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 1080-83.
24. Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, *et al.* Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992; **15**: 1147-53.
25. Roig T, Oliveira JR, Bartrons R, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994; **266**: C1722-28.
26. Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCF, *et al.* Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; **30**: 2069-74.
27. Nunes FB, Lunardelli A, Grazziotin C, *et al.* An assessment of fructose 1,6-bisphosphate as an antimicrobial and inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; **47**: 35-41.
28. Aiub CAF, Bortolini R, Azambuja AA, *et al.* Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2002; *in press*.
29. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2: IFCC method for aspartate aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; **24**: 497-510.
30. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3: IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; **24**: 481-95.

31. Société Française de Biologie Clinique (SFBC), Scientific committee. Recommendations for determining the catalytic concentration of lactate dehydrogenase in human serum at +30 °C. *Ann Biol Clin* 1982; **40**: 160-64.
32. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences* 1991; **48**: 301-09.
33. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; **86**: 271-78.
34. Mack JE, Kerr JA, Vreugdenhil PK, *et al.* Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-storage rat hepatocytes. *Cryobiology* 1991; **28**: 01-7.
35. Markov AK, Farias LA, Bennet WS, *et al.* Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate. *Pharmacology* 1991; **43**: 310-17.
36. Martin FL, McLean AEM. Comparison of protection by fructose against paracetamol injury with protection by glucose and fructose-1,6-diphosphate. *Toxicology* 1996; **108**: 175-84.
37. Rao MR, Olinde KD, Markov AK. Protection from amphotericin B-induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; **95**: 217-20.
38. Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, *et al.* Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1990; **10**: 167-76.
39. Espanol MT, Litt L, Hasegawa K, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. *Anesthesiology* 1998; **88**: 461-72.
40. Torras J, Borobia FG, Herrero I, *et al.* Hepatic preservation with a cold-storage solution containing fructose-1,6-diphosphate and manitol: evaluation with the isolated perfused rat liver and comparison with University of Wisconsin solution. *Transplant Proc* 1995; **27**: 2379-81.

41. Markov AK, Oglethorpe N, Terry J, *et al.* Stimulating effect of fructose 1,6-diphosphate on the phagocytic function of rat RES and on human leukocyte carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci* 1985; **290**: 03-10.
42. Peralta C, Rull R, Rimola A, *et al.* Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; **71**: 529-36.
43. Brass CA, Nunes F, Nagpal R. Increased oxyradical production during reoxygenation of perfused rat liver. Signal versus injury. *Transplantation* 1994; **58**: 1329-35.

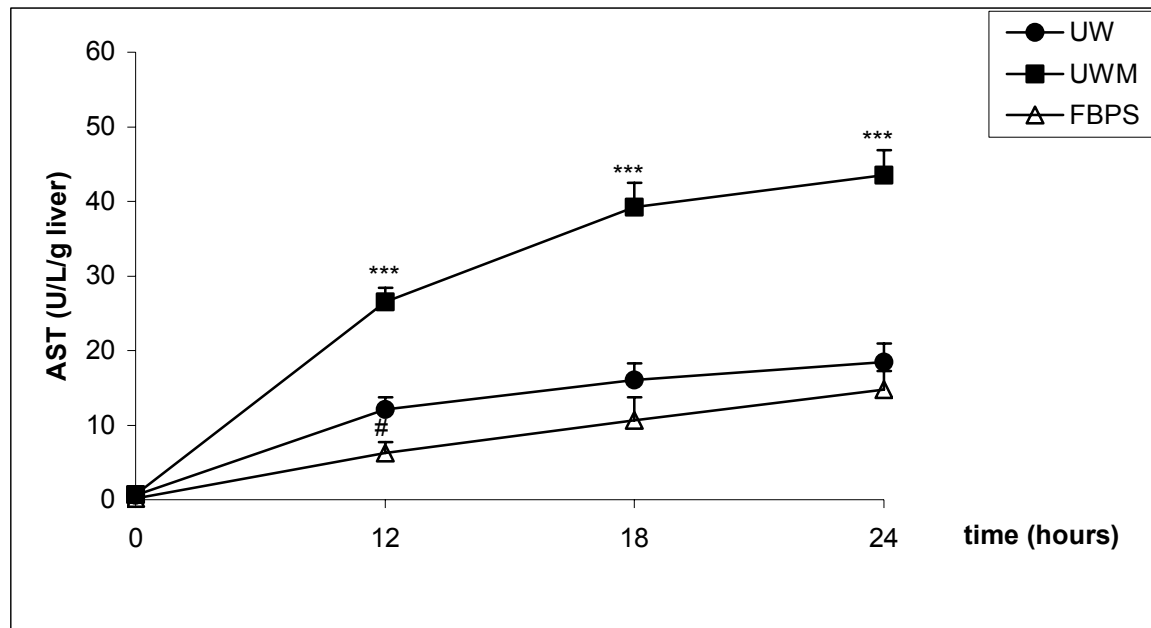


Figure 1. AST release obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW, UWM and FBPS cold storage solutions during 24 hours. Significant differences between UW and UWM groups were indicated by $***p < 0.001$ and between UW and FBPS groups by $\#p < 0.05$.

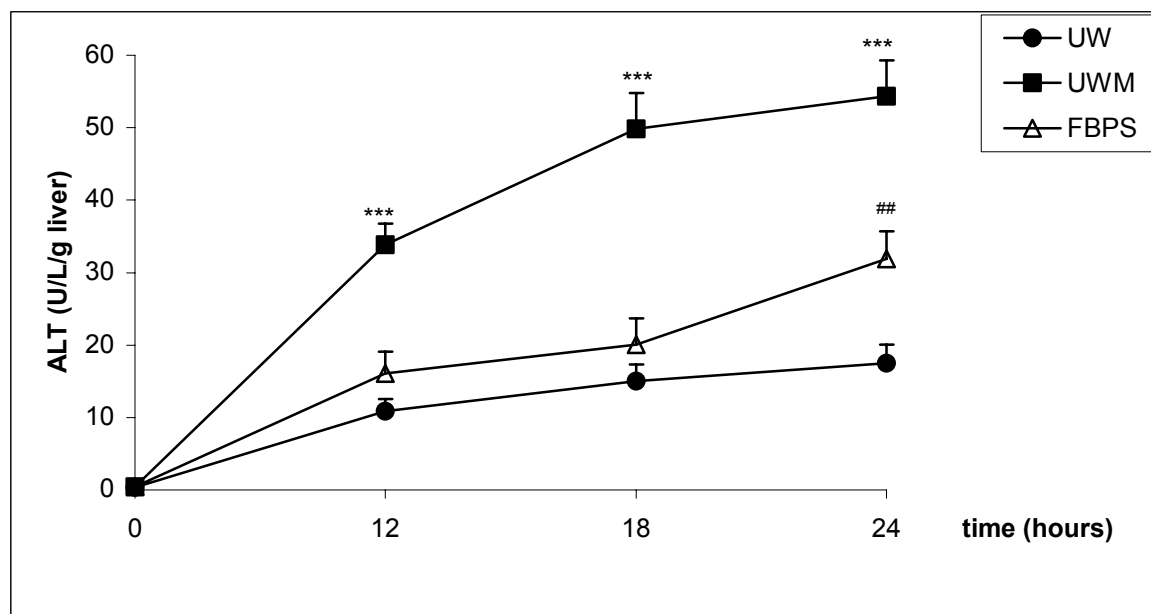


Figure 2. ALT release obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW, UWM and FBPS cold storage solutions during 24 hours. Significant differences between UW and UWM groups were indicated by $***p < 0.001$ and between UW and FBPS groups by $##p < 0.01$.

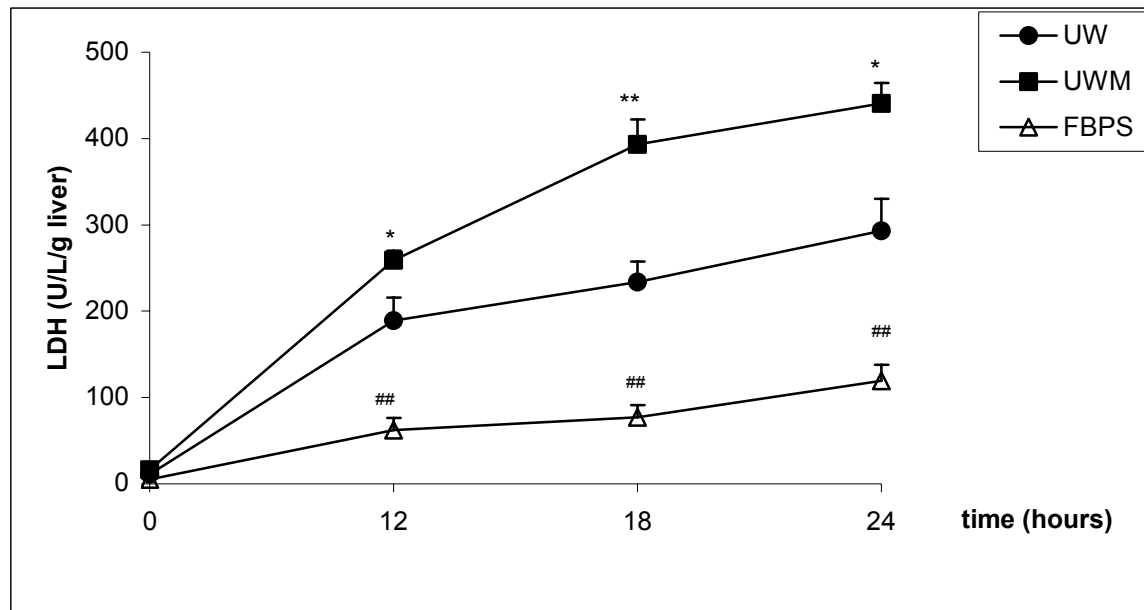


Figure 3. LDH release obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW, UWM and FBPS cold storage solutions during 24 hours. Significant differences between UW and UWM groups were indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and between UW and FBPS groups by ## $p < 0.01$.

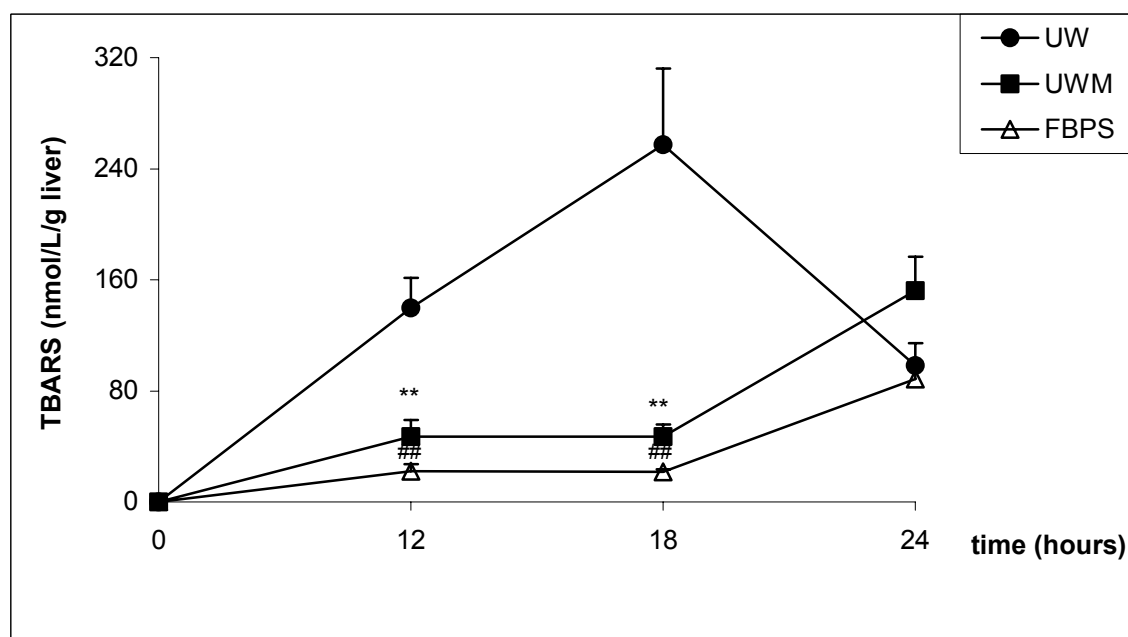


Figure 4. TBARS concentrations obtained from experimental groups where the livers were preserved in UW, UWM and FBPS cold storage solutions during 24 hours. Significant differences between UW and UWM groups were indicated by ** $p < 0.01$ and between UW and FBPS groups by ## $p < 0.01$.

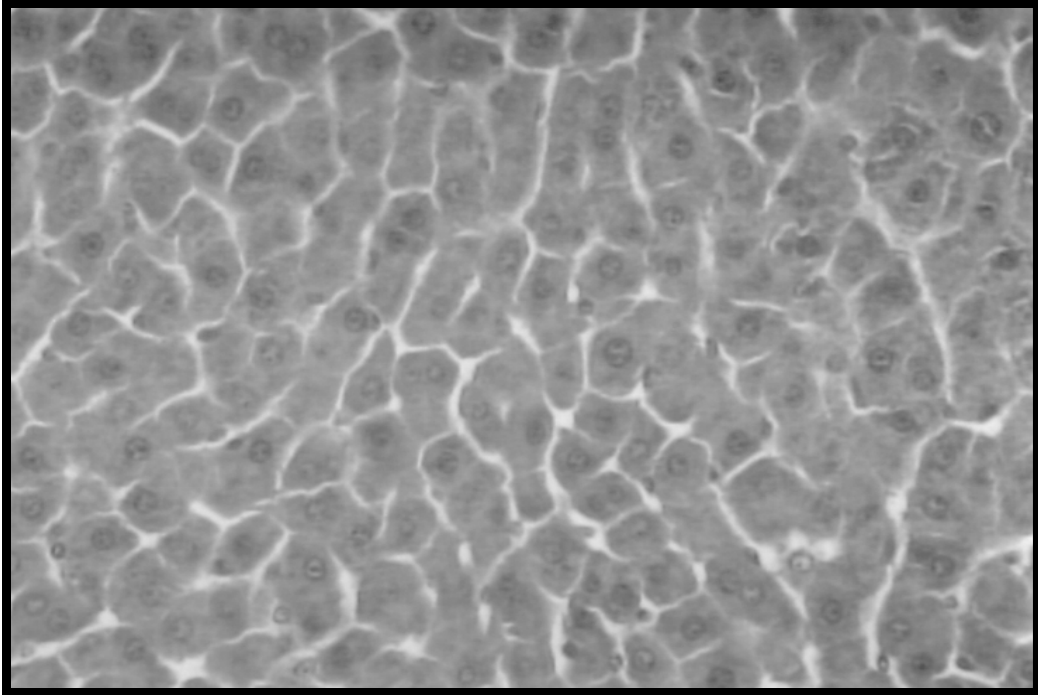


Figure 5. Microphotograph (HE 200 x) of liver perfused with UW cold storage solution at 0 hour. Hepatocytes show the cells limits and characters maintained.

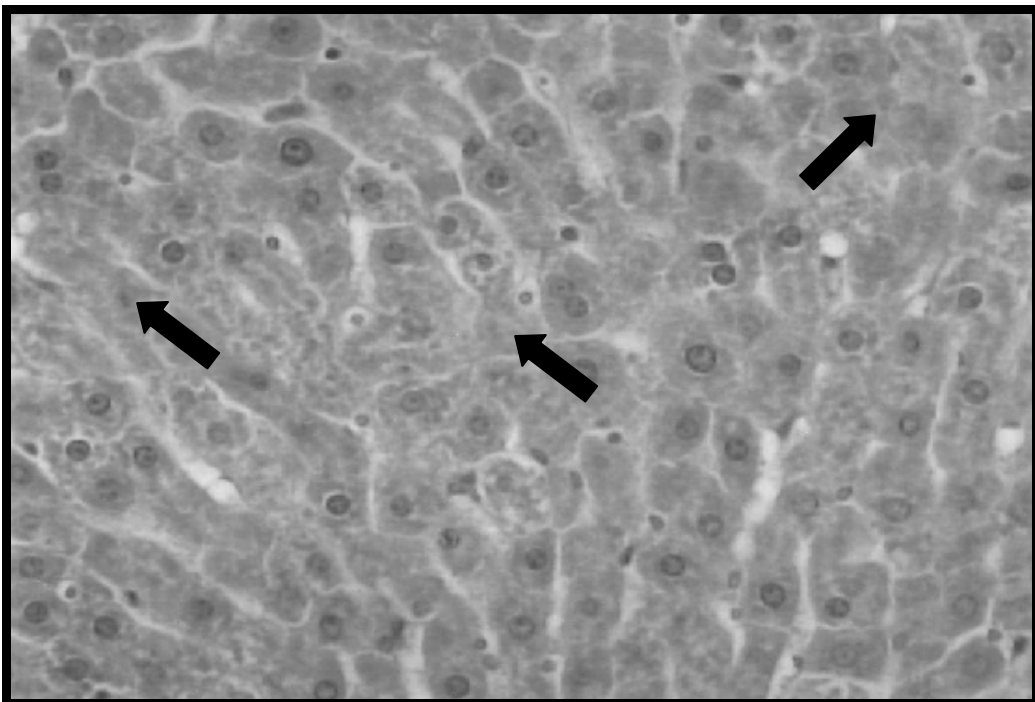


Figure 6. Microphotograph (HE 200 x) of liver perfused and preserved with UW cold storage solution for 24 hours. Some areas present cytolysis (*arrows*).

UTILIZAÇÃO DA FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO EM SOLUÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DE FÍGADOS

RESUMO: A solução de preservação da Universidade de Wisconsin (UW) é considerada a solução padrão para preservação de fígados, rins e pâncreas. A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é uma substância que apresenta efeito protetor do fígado contra injúrias provocadas por agentes químicos e ocorridas durante o período de isquemia-reperfusão. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da FBP na composição de soluções para preservação de fígados para transplante. Neste estudo experimental, a perfusão e a preservação dos fígados foram realizadas em cada grupo com as soluções de UW, UW contendo 10 mmol/L de FBP (UWM) e FBP 10 mmol/L (FBPS), respectivamente. Os fígados foram armazenados em um recipiente plástico contendo solução de preservação a 4°C por 24 horas. As mensurações bioquímicas de AST, ALT, LDH e TBARS foram realizadas em amostras das soluções de preservação nos tempos de 0, 12, 18 e 24 horas. A análise histológica foi realizada em fígados preservados por 24 horas. O grau de preservação observado com as soluções de UW e FBPS foi similar até 18 horas de armazenamento. A adição de 10 mmol/L de FBP à solução de UW provocou um aumento das injúrias ocorridas e uma pior preservação quando comparado ao grupo armazenado em UW. A FBP protegeu os fígados contra danos causados pelos radicais livres por tempos de preservação inferiores a 18 horas. Não houve diferença significativa entre os grupos na análise histológica dos fígados preservados no tempo de 24 horas. A FBP utilizada em solução foi eficaz na preservação de fígados, podendo ser um importante constituinte para outras formulações.

PALAVRAS-CHAVE: frutose-1,6-bisfosfato, fígado, preservação.

INTRODUÇÃO

A história da preservação de fígados para transplante iniciou nos anos 50 com a introdução do princípio da hipotermia para preservação de órgãos. Nos anos 60, Schalm *et al.* introduziram uma solução fria para preservar órgãos baseada na composição do plasma, conseguindo preservar fígados por um tempo superior a 4 horas.[1] Em 1969, Collins *et al.* descreveram uma solução fria para preservação de rins e esta solução, ou um de seus derivados, a solução de Eurocollins, ainda é utilizada na preservação de alguns órgãos.[2][3] Nos anos 70, Wall *et al.* introduziram uma solução contendo frações de proteínas plasmáticas e obtiveram um tempo de preservação para fígados de 4 horas.[4]

A introdução da solução de preservação da Universidade de Wisconsin (UW) em 1988 provocou profundas modificações nos procedimentos adotados para transplante de fígado.[5][6] A solução de UW é considerada padrão para a preservação de fígados, rins e pâncreas.[7][8] Os motivos pelos quais essa solução apresenta excelente qualidade de preservação ainda não são totalmente claros, porém estes resultados podem ser atribuídos principalmente à presença de precursores de adenosina trifosfato (ATP) e antioxidantes em sua formulação.[8][9]

Com a introdução de novas técnicas cirúrgicas e terapias de imunossupressão, o transplante hepático vem se tornando um procedimento cada vez mais comum e bem sucedido para o tratamento de doenças hepáticas em fase final.[10][11][12] Entretanto, a evolução do transplante hepático depende mais propriamente dos avanços nos métodos de preservação de órgãos do que nos progressos das técnicas cirúrgicas e de imunossupressão.[12][13]

Os aspectos importantes para uma bem sucedida solução de preservação incluem: hipotermia; prevenção da acidose intracelular porque a acidose tecidual pode danificar as células e ativar as enzimas lisossômicas; capacidade de proteger o órgão

de injúrias provocadas pelas espécies reativas do oxigênio (ROS) durante a isquemia/reperfusão e a capacidade de manter estável o metabolismo energético da célula.[14][15][16] Diminuição dos níveis de ATP, distúrbios nos níveis de cálcio intracelular e na ativação da fosfolipase A₂ têm sido descritos como os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na perda da viabilidade celular durante o período de isquemia. [17][18][19][20] A mensuração da atividade das enzimas realizada ao final do período de isquemia a frio no líquido onde o órgão é preservado pode fornecer importantes resultados para estimar anteriormente a “qualidade” do órgão para o transplante.[21] A liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH) constituem um importante índice para avaliar a qualidade da preservação do órgão.[22]

A frutose é um substrato glicolítico bem conhecido por proteger as células quando a síntese de ATP está comprometida.[23] A frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um intermediário altamente energético da glicólise, tem sido evidenciado por apresentar efeito protetor sobre fígados lesados por agentes químicos como a galactosamina [24] e também nos danos ocorridos durante a isquemia e reperfusão.[15][19] Os efeitos da FBP têm sido atribuídos principalmente a: (a) sua capacidade de aumentar o metabolismo dos carboidratos por intervenção na rota glicolítica, não somente como um regulador metabólico mas também como um substrato; (b) redução da demanda energética e um conseqüente aumento da eficiência metabólica; (c) estabilização das membranas celulares.[25] Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado recentemente que a FBP reduz o índice de mortalidade em sepse induzida experimentalmente em ratos [26][27] e também reduz os índices de necrose, provocando um aumento nos índices de apoptose em fígados de ratos.[28] O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da FBP na composição de soluções frias para preservação de fígados para transplante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para a realização deste estudo experimental foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais receberam alimentação *ad libitum* até 12 horas antes dos experimentos. Cada rato foi anestesiado com a administração intraperitoneal de 50 mg/kg de tiopental sódico. Os ratos utilizados neste estudo foram divididos em três grupos experimentais. O protocolo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Procedimento experimental

A perfusão e a preservação dos fígados foram realizadas com diferentes soluções de preservação em cada grupo. As soluções utilizadas neste estudo foram: solução de UW (n=10)(DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE), solução de UW contendo 10 mmol/L de FBP (UWM, n=7) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) e a solução de FBP (FBPS, n=7) contendo 10 mmol/L de FBP dissolvida em NaCl 0,9%. A osmolaridade das soluções foi respectivamente 320, 350 e 330 mOsm/L.

O procedimento cirúrgico foi realizado conforme descrito por Schalm *et al.*[1] A veia Porta foi canulada e os fígados foram perfundidos com solução de preservação fria a 4 °C a uma pressão constante de perfusão de 60 cm de H₂O, sendo posteriormente armazenados em um recipiente plástico contendo 60 mL da mesma solução utilizada e armazenados a 4 °C por 24 horas. Foram retiradas alíquotas das amostras de soluções de preservação que continham os fígados nos tempos de 0, 12, 18 e 24 horas para a realização das mensurações bioquímicas de AST, ALT, LDH e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A mensuração da atividade das enzimas AST, ALT e LDH foi realizada no equipamento Cobas Integra 700 (Roche Diagnostics, Basel, Suíça) com a utilização de reagentes Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) de acordo com os métodos padrões.[29][30][31] A determinação da concentração de TBARS é um importante parâmetro para avaliar a peroxidação lipídica induzida pelas espécies reativas do oxigênio.[32][33][34] A concentração de TBARS foi determinada em amostras de líquidos de preservação pela reação colorimétrica com ácido tiobarbitúrico.[33] Após concluído o período de 24 horas de preservação, os fígados foram utilizados para confecção de lâminas e avaliação histológica. As lâminas obtidas das amostras de fígados foram coradas por hematoxilina-eosina (HE). Foram criados escores de acordo com o grau de citólise para a realização da avaliação histológica (1: sem alterações; 2: citólise em grau leve; 3: citólise em grau moderado e 4: citólise em grau severo).

Análise estatística

Os valores das enzimas e TBARS são expressos em média \pm erro padrão. A análise estatística das enzimas e TBARS foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados da análise histológica foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

Após 12, 18 e 24 horas de preservação, a liberação da enzima AST no grupo preservado com a solução de UWM foi significativamente maior do que o observado no grupo preservado com a solução de UW ($p < 0,001$, Fig. 1). Entretanto, a liberação da enzima AST observada no grupo de FBPS foi menor do que o observado no grupo de UW após 12 horas de preservação ($p < 0,05$, Fig. 1), não havendo diferença significativa entre ambos após 18 e 24 horas de preservação. Em relação à liberação

de ALT, foi possível constatar que a mesma foi maior no grupo de UWM do que no grupo de UW após 12, 18 e 24 horas de preservação ($p < 0,001$, Fig. 2). Quanto ao grupo preservado com FBPS, o mesmo apresentou uma maior liberação de ALT após 24 horas do que a apresentada pelo grupo preservado com UW ($p < 0,01$, Fig. 2), porém, não houve diferença significativa após 12 e 18 horas de preservação.

A liberação de LDH observada no grupo de UWM foi maior do que a observada no grupo de UW após 12, 18 e 24 horas de preservação ($p < 0,05$, Fig. 3). Entretanto, a liberação de LDH foi menor nos fígados preservados com FBPS do que nos preservados com UW por 12, 18 e 24 horas ($p < 0,01$, Fig. 3). Os valores de TBARS foram menores nos grupos preservados com FBPS e UWM quando comparados ao preservado com UW por 12 e 18 horas ($p < 0,01$, Fig. 4); porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos em 24 horas de preservação.

A avaliação histológica dos fígados preservados por 24 horas demonstrou presença de citólise em grau leve a moderado, preponderando os escores 2 e 3, nos órgãos preservados com UW, UWM e FBPS, porém não foram evidenciadas diferenças significativas entre esses grupos após as 24 horas de preservação. As figuras 5 e 6 demonstram respectivamente o aspecto dos fígados preservados por 0 e 24 horas em solução fria.

DISCUSSÃO

O transplante hepático é aceito atualmente como tratamento de escolha para doenças hepáticas em estágio final de desenvolvimento devido aos excelentes resultados obtidos neste procedimento. Esses resultados podem ser atribuídos principalmente aos avanços nas técnicas cirúrgicas, terapias de imunossupressão e das soluções para preservação de órgãos.[13] A frutose- 1,6-bisfosfato (FBP), um intermediário altamente energético da glicólise, tem sido objeto de vários estudos, sendo que alguns destes têm demonstrado o efeito protetor desta substância em

fígados lesados por toxinas [24][28][35], em injúrias induzidas por drogas como o paracetamol [36] e anfotericina B [37], em sepse induzida experimentalmente [26][27] e em outros órgãos como coração [38] e cérebro.[39] A FBP também apresenta efeito protetor contra as injúrias ocorridas no fígado durante a isquemia e reperfusão.[15][19][40] O mecanismo envolvido responsável pelos efeitos da FBP ainda é incerto, porém alguns autores [19][24][40][41] têm sugerido que este açúcar bifosforilado atravessa as membranas celulares e recupera a atividade glicolítica, intervindo na rota glicolítica como substrato e não somente como regulador metabólico. Outras possíveis explicações podem incluir a interação da FBP com as membranas celulares e a modificação da permeabilidade a íons.[24]

A concentração de FBP utilizada neste estudo (10 mmol/L) foi a mesma sugerida por Hirokawa *et al.* [13] e Sano *et al.* [19] em seus respectivos estudos. A liberação das enzimas AST e LDH na FBPS foi menor do que a observada na solução de UW durante 24 horas de preservação, enquanto que a liberação da enzima ALT foi maior somente com 24 horas de preservação. Esses resultados indicam que os fígados armazenados em FBPS apresentaram um grau de preservação muito semelhante aos armazenados na solução de UW por um tempo de até 18 horas. Em relação à solução de UW contendo 10 mM de FBP (UWM), foi possível observar que os fígados armazenados nesta apresentaram uma maior liberação das enzimas AST, ALT e LDH durante as 24 horas, o que indica que a adição de 10 mM de FBP à solução de UW foi prejudicial e provocou danos aos fígados e uma piora no grau de preservação dos mesmos quando comparado ao grupo preservado com solução de UW.

Os resultados similares de preservação entre os fígados armazenados nas soluções de FBPS e UW podem ser atribuídos às propriedades protetoras que a FBP apresenta contra danos hepáticos. Um dos principais aspectos envolvidos na morte celular é a queda dos níveis intracelulares de ATP. Além disso, também ocorre uma alteração na permeabilidade da membrana e no fluxo de íons, sendo observado um

aumento do nível intracelular de Ca^{2+} . A FBPS se demonstrou eficaz na preservação dos fígados avaliados neste estudo. A FBP interage com a membrana e mantém a viabilidade da célula através da estabilização da membrana celular. A FBP também preserva os níveis intracelulares de ATP pela ativação da rota glicolítica.[19][24][25][36] Estas funções são importantes para a manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento do fígado.[13] A FBP controla a homeostasia do Ca^{2+} intracelular porque ela possui uma ação quelante sobre este íon. Hirokawa *et al.* demonstraram que a FBP inibe a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células de Kupffer isoladas de ratos.[13]

A avaliação da peroxidação lipídica realizada nos fígados demonstrou que as concentrações de TBARS foram menores nos grupos preservados com FBPS e UWM por um período de até 18 horas. Quando preservados por 24 horas, não houve diferença nas concentrações de TBARS entre os grupos. Na análise do grau de lipoperoxidação observado nos fígados preservados para transplante, foi verificado que a FBP protegeu as células hepáticas desses danos nas soluções que a continham em sua formulação por períodos de até 18 horas. Esses resultados indicam que a FBP pode suprimir a peroxidação lipídica induzida por radicais livres.

Alguns autores relataram que a FBP é capaz de suprimir a formação de radicais livres [13] e a peroxidação lipídica.[19][38] Tavazzi *et al.* [38] demonstraram que o nível da lipoperoxidação em corações de ratos aumentou significativamente durante a reoxigenação e que este aumento foi completamente inibido com a administração de FBP. Eles também observaram que a conversão da enzima xantina desidrogenase para xantina oxidase, processo este reconhecido como a principal fonte do ânion superóxido, ocorrida no coração durante a isquemia foi inibida pela ação da FBP.[38]

Peralta *et al.* relataram ausência de correlação entre o estresse oxidativo e o grau de injúria hepática, o que contraria a hipótese de que o estresse oxidativo é o principal fator responsável pelos danos ocorridos durante a isquemia/reperfusão

hepática.[42] Esta proposta tem sido defendida por Brass *et al.*[43] Nossos resultados também demonstraram ausência de associação entre a liberação das enzimas AST, AST e LDH e as concentrações de TBARS.

Em nosso estudo, os fígados preservados em UW e FBPS apresentaram um melhor grau de preservação do que o observado no grupo preservado em UWM. A solução de UW apresenta uma complexa formulação e a FBP pode ter interagido com algum de seus componentes provocando a inativação do(s) mesmo(s) dentro da formulação. Hirokawa *et al.* demonstraram que a adição de 10 mmol/L de FBP à solução de UW controlou a secreção de citocinas e óxido nítrico (NO) nas células de Kupffer, entretanto, eles removeram glutatión, adenosina, alopurinol e hidroxietilamido da solução de UW e adicionaram 10 mmol/L de FBP a esta solução.[13] Na solução UWM, nós adicionamos 10 mmol/L de FBP à solução de UW e não removemos da formulação os componentes glutatión, adenosina, alopurinol e hidróxietilamido. Os fígados armazenados em UW, UWM e FBPS não apresentaram diferenças significativas das características histológicas entre si após 24 horas de preservação. A mensuração da atividade das enzimas na solução de preservação é mais sensível para a detecção de alterações do que a análise baseada em morfologia.[21]

A FBPS contendo 10 mmol/L de FBP protegeu os fígados durante o período de armazenamento avaliado neste estudo e o grau de preservação observado com FBPS foi similar ou melhor do que o observado com a solução de UW. Entretanto, o grau de preservação obtido com a solução UWM contendo 10 mmol/L de FBP foi pior do que o observado com as demais soluções testadas. Considerando o elevado custo da solução de UW, a FBP pode ser um importante componente para a formulação de outras soluções, como a FBPS, para a preservação de fígados. Entretanto, nossos resultados devem ser confirmados em um modelo de transplante utilizando fígados humanos.

REFERÊNCIAS

1. Schalm SW, Terpstra JL, Drayer B, *et al.* A simple method for short-term preservation of a liver homograft. *Transplantation* 1969; **8**: 877-81.
2. Collins GM, Bravo-Sugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation: initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 1969; **2**: 1219-22.
3. Dreikorn K, Horsch R, Rohl L. 48 to 96 hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins solution. *Eur Urol* 1980; **6**: 221-24.
4. Wall WJ, Calne RY, Herbertson BM, *et al.* Simple hypothermic preservation for transporting human livers long distances for transplantation. *Transplantation* 1977; **23**: 210-16.
5. Pokorny H, Grünberger T, Rockenschaub S, *et al.* Preservation of the liver: is it possible to extend the time of storage? *Transplant Proc* 1999; **31**: 2074-76.
6. García-Valdecasas JC, González FJ, Grande L, *et al.* Study of liver preservation: the use of University of Wisconsin or Euro-Collins solutions alone or in a combined method. *Transplant Proc* 1991; **23**: 2453-55.
7. Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 2069-70.
8. Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, *et al.* Important components of the UW solution. *Transplantation* 1990; **49**: 251-57.
9. Boudjema K, Ellero B, Barguil Y, *et al.* Addition of reduced glutathione to UW solution: clinical impact in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; **23**: 2341-43.
10. Klempnauer J, Schrem H, Becker T, *et al.* Liver transplantation today. *Transplant Proc* 2002; **33**: 3433-35.

11. Brass CA, Crawford JM, Narciso JP, *et al.* Evaluation of University of Wisconsin cold-storage solution in warm hypoxic perfusion of rat liver: the addition of fructose reduces injury. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1455-63.
12. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, *et al.* Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 1988; **46**: 517-22.
13. Hirokawa F, Nakai T, Yamaue H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; **74**: 779-83.
14. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; **45**: 673-76.
15. Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1992; **16**: 325-39.
16. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, *et al.* Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ase activity in the perfused rat liver after cold preservation. *Transplant Proc* 1997; **29**: 1328-30.
17. Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, *et al.* Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; **386**: 31-37.
18. Kim JS, Southard JH. Effect of liver preservation on hepatocyte calcium and ATP regeneration. *Transplant Proc* 1997; **29**: 3447-48.
19. Sano W, Watanabe F, Tamai H, *et al.* Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1785-92.
20. Michel P, Ferrera R. Importance of calcium during hypothermic myocardial preservation with standard and modified UW solutions. *Transplant Proc* 2002; **34**: 1118-20.

21. Lange R, Erhard J, Rauhen U, *et al.* Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; **62**: 1255-59.
22. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, *et al.* An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; **46**: 512-16.
23. Yu CH, Leng XS, Peng JR, *et al.* Fructose protects rat hepatocytes against hypoxic injury during the process of isolation and microencapsulation. *Transplant Proc* 1999; **31**: 1080-83.
24. Oliveira JR, Rosa JL, Ambrosio S, *et al.* Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992; **15**: 1147-53.
25. Roig T, Oliveira JR, Bartrons R, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994; **266**: C1722-28.
26. Nunes FB, Pires MGS, Alves Filho JCF, *et al.* Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med* 2002; **30**: 2069-74.
27. Nunes FB, Lunardelli A, Grazziotin C, *et al.* An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res* 2003; **47**: 35-41.
28. Aiub CAF, Bortolini R, Azambuja AA, *et al.* Alterations in the indexes of apoptosis and necrosis induced by galactosamine in the liver of Wistar rats treated with fructose-1,6-bisphosphate. *Hepatol Res* 2002; *in press*.
29. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2: IFCC method for aspartate aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; **24**: 497-510.

30. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3: IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; **24**: 481-95.
31. Société Française de Biologie Clinique (SFBC), Scientific committee. Recommendations for determining the catalytic concentration of lactate dehydrogenase in human serum at +30 °C. *Ann Biol Clin* 1982; **40**: 160-64.
32. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences* 1991; **48**: 301-09.
33. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; **86**: 271-78.
34. Mack JE, Kerr JA, Vreugdenhil PK, *et al.* Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-storage rat hepatocytes. *Cryobiology* 1991; **28**: 01-7.
35. Markov AK, Farias LA, Bennet WS, *et al.* Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate. *Pharmacology* 1991; **43**: 310-17.
36. Martin FL, McLean AEM. Comparison of protection by fructose against paracetamol injury with protection by glucose and fructose-1,6-diphosphate. *Toxicology* 1996; **108**: 175-84.
37. Rao MR, Olinde KD, Markov AK. Protection from amphotericin B-induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; **95**: 217-20.
38. Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, *et al.* Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart: prevention by exogenous fructose-1,6-bisphosphate. *Free Rad Res Comms* 1990; **10**: 167-76.
39. Espanol MT, Litt L, Hasegawa K, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. *Anesthesiology* 1998; **88**: 461-72.

40. Torras J, Borobia FG, Herrero I, *et al.* Hepatic preservation with a cold-storage solution containing fructose-1,6-diphosphate and manitol: evaluation with the isolated perfused rat liver and comparison with University of Wisconsin solution. *Transplant Proc* 1995; **27**: 2379-81.
41. Markov AK, Oglethorpe N, Terry J, *et al.* Stimulating effect of fructose 1,6-diphosphate on the phagocytic function of rat RES and on human leukocyte carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci* 1985; **290**: 03-10.
42. Peralta C, Rull R, Rimola A, *et al.* Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; **71**: 529-36.
43. Brass CA, Nunes F, Nagpal R. Increased oxyradical production during reoxygenation of perfused rat liver. Signal versus injury. *Transplantation* 1994; **58**: 1329-35.

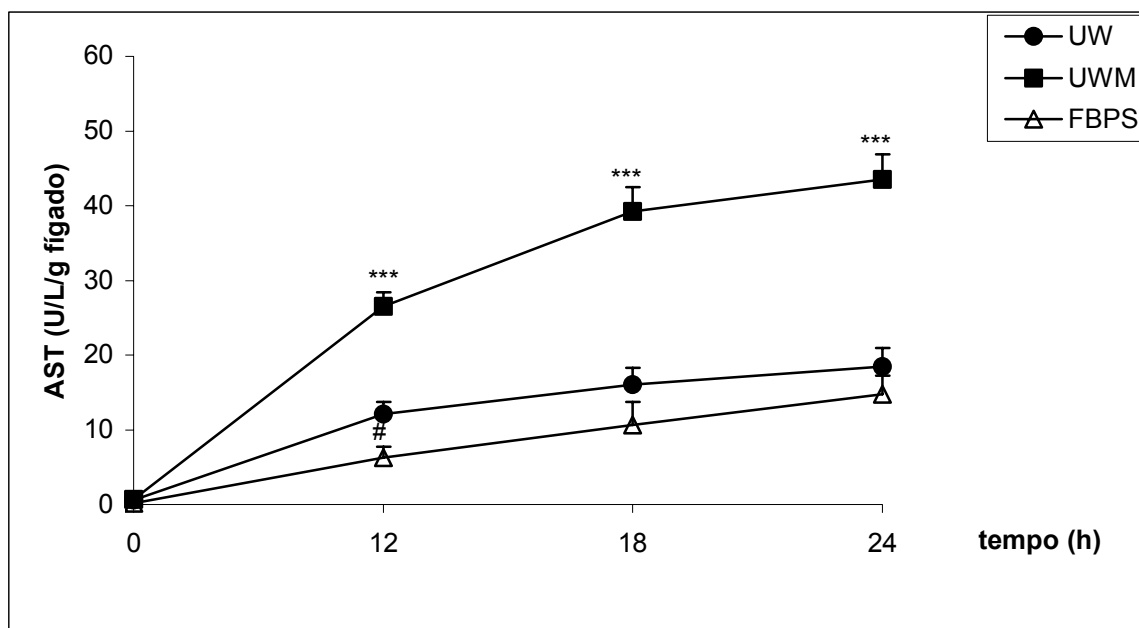


Figura 1. Níveis de AST obtidos nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4 °C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por *** $p < 0,001$ e entre os grupos UW e FBPS por # $p < 0,05$.

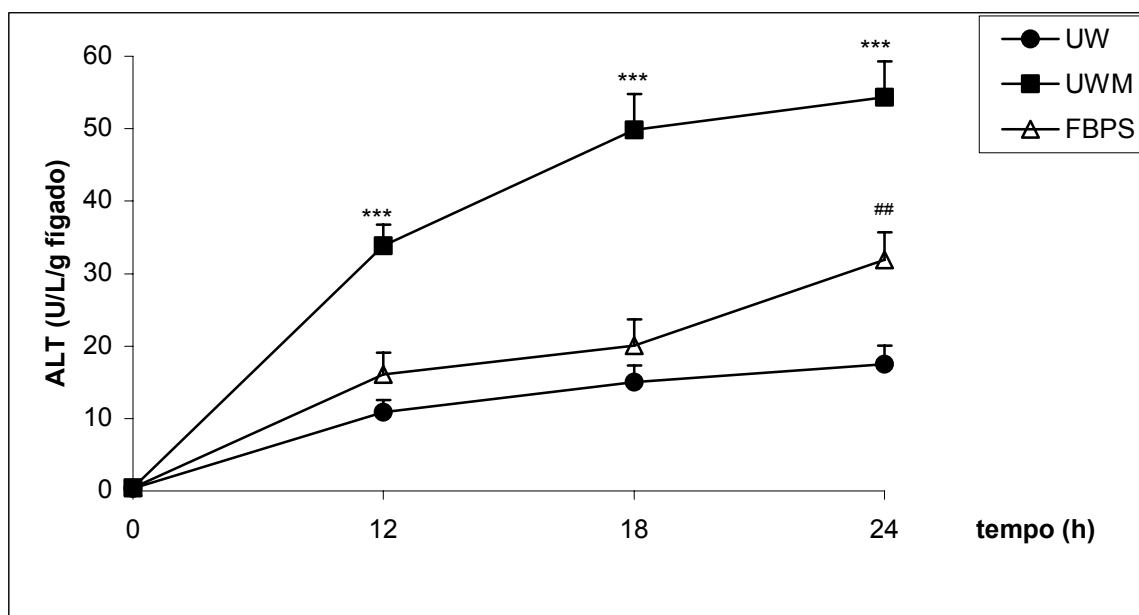


Figura 2. Níveis de ALT obtidos nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4 °C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por *** $p < 0,001$ e entre os grupos UW e FBPS por ## $p < 0,01$.

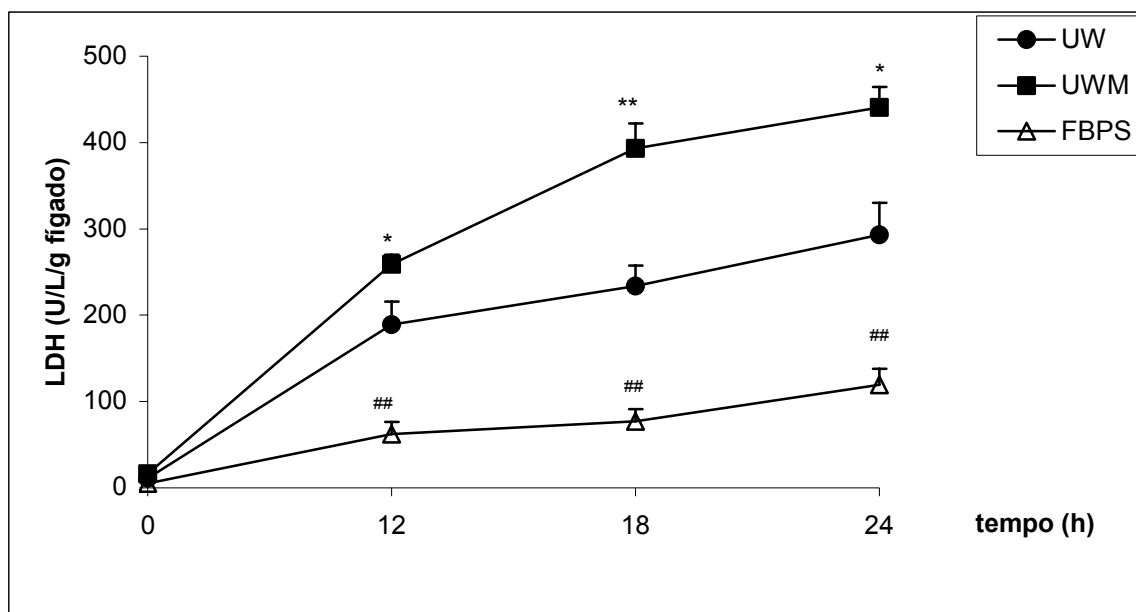


Figura 3. Níveis de LDH obtidos nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4 °C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e entre os grupos UW e FBPS por ## $p < 0,01$.

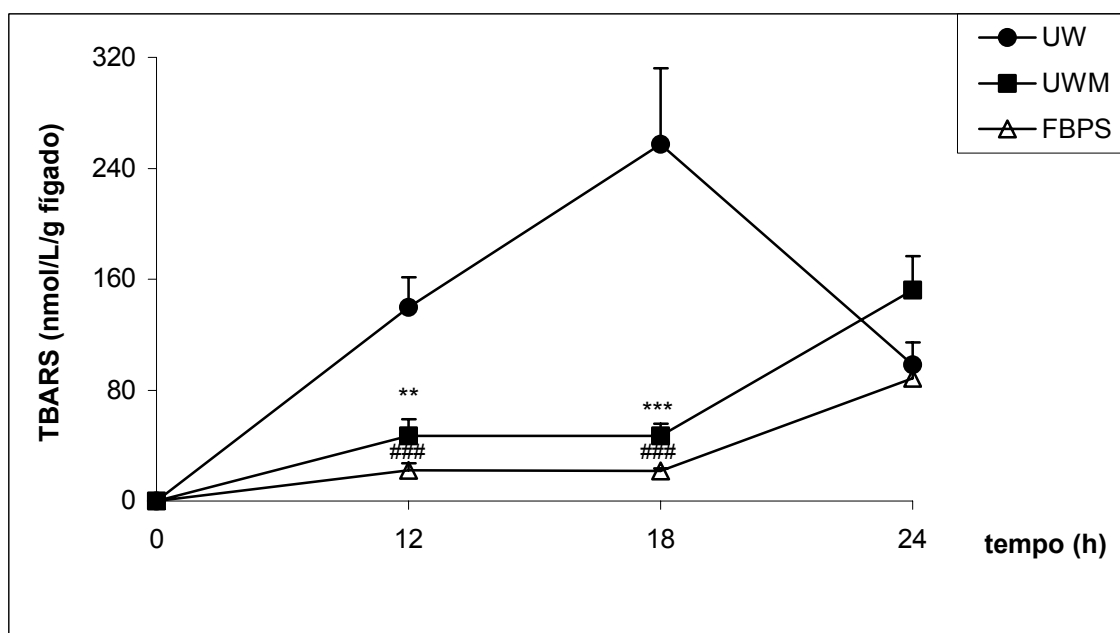


Figura 4. Concentrações de TBARS obtidas nos grupos experimentais cujos fígados foram preservados a 4 °C por até 24 horas nas soluções de UW, UWM e FBPS. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos UW e UWM são indicadas por ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e entre os grupos UW e FBPS por ### $p < 0,001$.

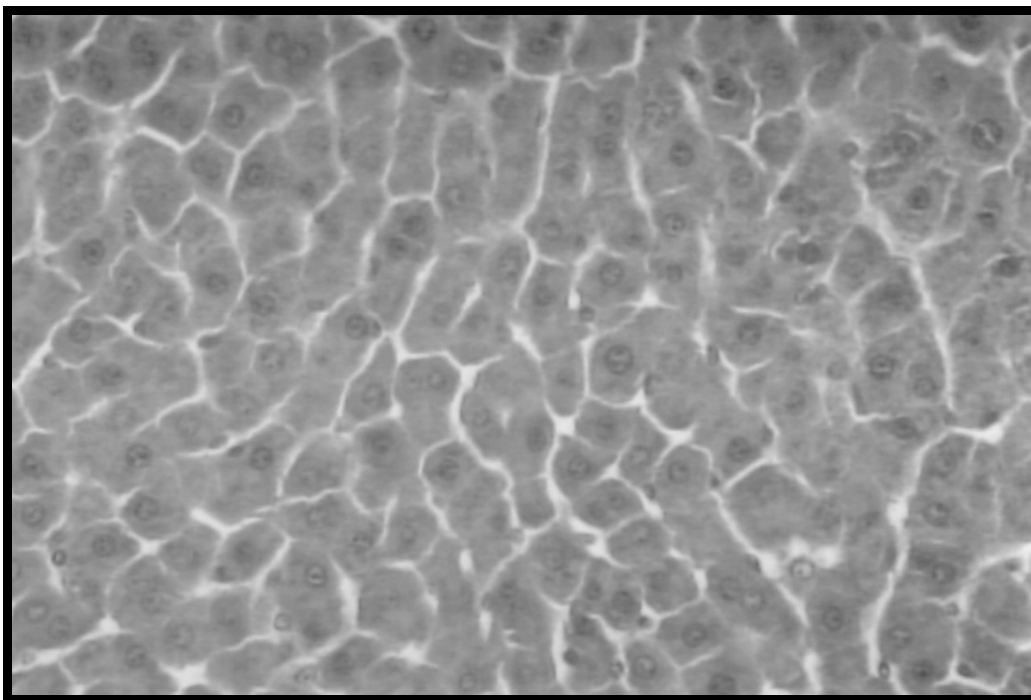


Figura 5. Micrografia (HE 200 x) de fígado perfundido com solução de UW a 4°C no tempo de 0 hora. Hepatócitos apresentando seus limites e características celulares preservadas.

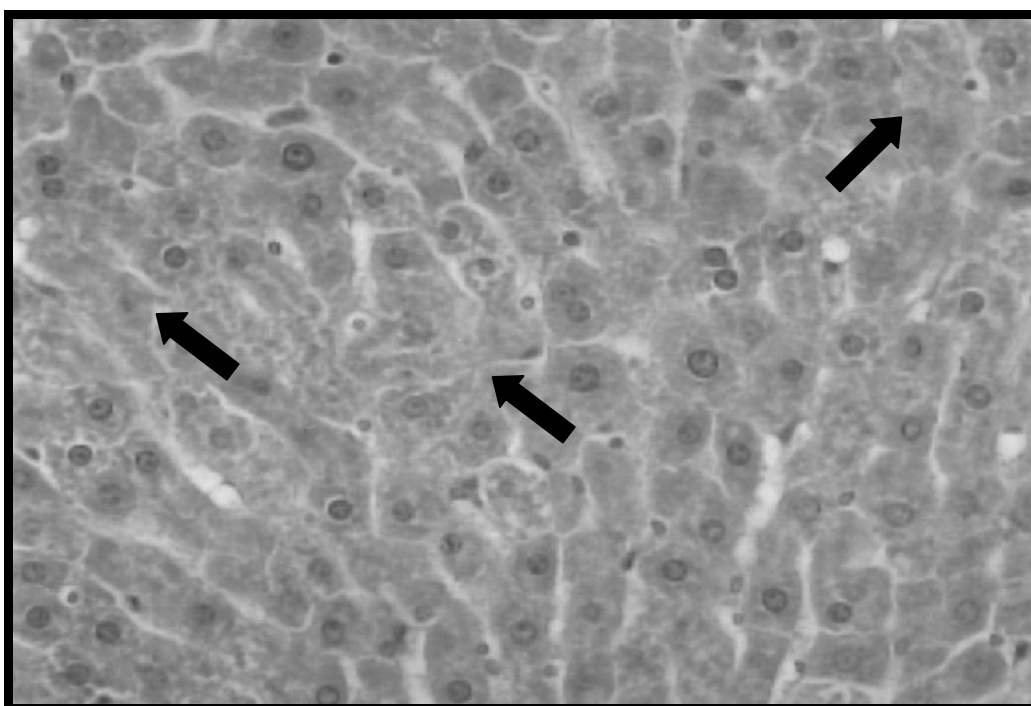


Figura 6. Micrografia (HE 200 x) de fígado perfundido com solução de UW e preservado a 4°C por 24 horas. Visualização de hepatócitos apresentando rompimento dos limites celulares com presença de um moderado grau de citólise (*setas*).