



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS
CURSO DE DOUTORADO**

**HIPOTERMIA HEPÁTICA TÓPICA ASSOCIADA AO PRÉ-
CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
BIOQUÍMICA DOS DANOS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM MODELO
EXPERIMENTAL COM 24 HORAS DE EVOLUÇÃO**

Autor: Gémerson Gabiatti

**Orientadores: Prof. Dr. Carlos Otávio Corso
Dr. Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia como pré-
requisito obrigatório para a obtenção do título
de doutor em Medicina: Cirurgia.**

Porto Alegre, 2018.

Catalogação Biblioteca UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Gabiatti, Gemerson

HIPOTERMIA HEPÁTICA TÓPICA ASSOCIADA AO PRÉ-
CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
BIOQUÍMICA DOS DANOS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM
MODELO EXPERIMENTAL COM 24 HORAS DE EVOLUÇÃO /
Gemerson Gabiatti. -- 2018.

92 f.

Orientador: Carlos Otavio Corso.

Coorientador: Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Isquemia e Reperfusão Hepática. 2. Hipotermia
Tópica. 3. Pré-Condicionamento Isquêmico. I. Corso,
Carlos Otavio, orient. II. Grezzana Filho, Tomaz de
Jesus Maria, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

Aos meus pais, que sempre souberam indicar o caminho mais adequado a ser trilhado e que sempre acreditaram no potencial de seus filhos.

Aos meus mestres, pelo conhecimento transmitido e pela dúvida compartilhada, razão pela qual este projeto nasceu.

À minha família, Sizette e Helena, que sempre soube me apoiar durante a execução do intenso cronograma de procedimentos deste desafio.

Agradecimentos

Aos Prof. Dr. Tomaz Grezzana, pelos ensinamentos e pelo treinamento necessário a execução deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Otávio Corso e ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFRGS, pela oportunidade de participar de tão prestigiado curso.

Aos colegas Carlos Bofill, Samanta Rossi e Lisiane Treis pela ajuda em todas as etapas deste longo projeto de pesquisa.

À Prof.^a Stela Castro, do Grupo de Pesquisa em Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela dedicação em nos ajudar na avaliação estatística dos dados coletados.

À Prof.^a Stella Valle, à Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima e à Mariana Olinto Dreyer da Silva, da Faculdade de Veterinária da UFRGS – Laboratório LACVet, pelo apoio na obtenção de kits específicos e na avaliação laboratorial bioquímica dos materiais coletados.

Ao Prof. Carlos Thadeu Schmidt Cerski do Serviço de Patologia do HCPA, pela análise histopatológica e pelas orientações acerca dos achados nas lâminas.

À Enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e à Bióloga Fabíola Schons Meyer, da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, pelo suporte durante a execução dos procedimentos cirúrgicos relacionados ao projeto.

Lista de Abreviaturas

ALT	Alanina Aminotransferase
AMO	Amônia
AMP	Adenosina Monofosfato
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BD	Bilirrubina Direta
BT	Bilirrubina Total
C	Controle
CHSM	Classificação Histopatológica de Suzuki Modificada
CI	Condicionamento Isquêmico
CS	Congestão Sinusoidal
CVF	Cobra Venom Factor
DH	Degeneração Hidrópica
E	Esteatose
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESM	Escore de Suzuki Modificado
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
GLI	Glicose
HT	Hipotermia Tópica
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Intercelular 1)
IL	Interleucina
ILN	Infiltrado Leucocitário Neutrofílico
IN	Isquemia Normotérmica
IR	Isquemia e Reperfusão
IRH	Isquêmica e Reperfusão Hepática
LAC	Lactato
LDH	Lactato Desidrogenase
NZ	Necrose de Zona
ON	Óxido Nítrico
PCI	Pré-Condicionamento Isquêmico
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Celular Vascular 1)

Lista de Figuras e Tabelas da Tese

Figura 01: Diagrama esquemático dos mecanismos celulares de lesão na IRH dentro de um sinusoide hepático e área circundante-----	11
Figura 02: Resumo dos mecanismos intracelulares envolvidos na IRH----	12
Figura 03: Mecanismos de ação do PCI-----	20
Figura 04: Mecanismos de modulação da apoptose pela hipotermia-----	24
Tabela 1: Outras Substâncias Testadas no Controle da IRH-----	18

Lista de Figuras, Fórmulas e Tabelas do Artigo Original em Português

Figura 1: Representação esquemática tridimensional do zoneamento hepático -----	66
Figura 2: Níveis de Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT) e Gama Glutamil Transpeptidase (GGT) no plasma de 24 horas para todos os grupos -----	67
Figura 3: Níveis de Fosfatase Alcalina (FA), Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) no plasma de 24 horas para todos os grupos -----	68
Figura 4: Escore de Suzuki Modificado para amostras FI de todos os grupos -----	69
Fórmula 1: ESM: Escore de Suzuki Modificado-----	66
Tabela 1: Classificação Histopatológica de Suzuki Modificada (CHSM)--	70

List of Figures, Formulas and Tables of the Original Article in English

Figure 1: Schematic representation of three-dimensional liver zoning -----	79
Figure 2: Levels of DB, TB and GGT in 24-hour plasma for all groups ---	81
Figure 3: Levels of AP, LDH, AST and ALT in 24-hour plasma for all groups -----	82
Figure 4: MSS for ischemic liver samples of all groups -----	83
Formula 1: MSS, modified Suzuki score-----	80
Table 1: Modified Histopathological Classification of Suzuki (MHCS)---	79

Sumário

	Dedicatória-----	03
	Agradecimentos-----	04
	Lista de Abreviaturas da Tese-----	05
	Lista de Figuras, Fórmulas e Tabelas da Tese e dos Artigos-----	06
1	Introdução -----	08
2	Referencial Teórico -----	09
2.1	Fisiopatologia da Isquemia e Reperusão-----	09
2.2	Mecanismos de Proteção contra os efeitos da IRH-----	17
2.2.1	Terapias Farmacológicas da IRH-----	17
2.2.2	Terapias Cirúrgicas da IRH-----	18
2.2.3	Terapia Hipotérmica da IRH-----	21
2.2.4	Terapia Combinada da Hipotermia com o Condicionamento Isquêmico-----	26
3	Objetivos-----	28
4	Hipótese -----	29
5	Referências -----	30
6	Artigo em Português com Lista de Abreviaturas -----	47
6.1	Resumo e Palavras-Chave -----	49
6.2	Introdução -----	51
6.3	Materiais e Métodos -----	52
6.4	Resultados -----	57
6.5	Discussão -----	58
6.6	Referências -----	63
6.7	Fórmulas e Imagens -----	66
6.8	Tabelas -----	70
7	Article in English with List of abbreviations -----	71
7.1	Abstract and Key Words -----	72
7.2	Introduction -----	74
7.3	Methods -----	75
7.4	Results -----	81
7.5	Discussion -----	84
7.6	References -----	89
7.7	Certificate of English Editing -----	92

1 - Introdução

O fenômeno de isquemia e reperfusão hepática (IRH) tem sido objeto de intenso estudo nas últimas décadas ⁽¹⁾. Mesmo considerando o aspecto único de duplo suprimento sanguíneo hepático, arterial e venoso portal, com seus mecanismos compensatórios conhecidos, além de sua capacidade metabólica anaeróbica em função dos estoques de glicogênio, o fígado pode ser alvo de dano hipóxico secundário a várias condições patológicas presentes em inúmeros cenários assistenciais, incluindo trauma ⁽²⁾, choque hemorrágico e ressuscitação cardíaca, choque séptico, insuficiências cardíaca e respiratória, cirurgias vasculares periféricas ⁽³⁾, hepatectomias e transplante hepático. No fígado a consequência da isquemia seguida de reperfusão é uma resposta inflamatória aguda, seguida por intenso dano celular e disfunção orgânica ⁽⁴⁾.

A necessidade futura de grandes procedimentos sobre o fígado tende a aumentar, considerando que o número potencial de pacientes cirúrgicos com malignidades e doença hepática concomitante deve aumentar, com conseqüente maior número de procedimentos a serem realizados em hepatopatas ^(5, 6). A mesma expectativa existe em relação ao transplante hepático, onde a lacuna entre a demanda e a disponibilidade de órgãos tem sido parcialmente suprido com enxertos sub-ótimos, tornando o quadro de IRH ainda mais relevante, necessitando então de estratégias efetivas para seu controle ⁽⁷⁾.

Com a introdução das técnicas de controle do pedículo vascular hepático ^(8, 9), a isquemia e a reperfusão têm sido consideradas elementos-chave nos resultados de morbimortalidade pós-operatória, uma vez que complicações graves como a disfunção e/ou a insuficiência hepática podem resultar deste processo de reperfusão, o qual também pode comprometer outros órgãos e sistemas ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾, sendo os principais mecanismos envolvidos a geração de radicais livres de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) ⁽¹⁵⁾ somados a infiltração de polimorfonucleares, entre outros mecanismos de lesão celular ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Em situações de normotermia, o fígado consegue

tolerar o clameamento dos vasos do seu pedículo por aproximadamente 1 hora quando o parênquima hepático é normal e proteção adicional se faz necessária quando se trata de fígados doentes ⁽¹⁹⁾.

Para minimizar os efeitos da IRH, diversos métodos têm sido estudados, incluindo entre estes o Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI) e a Hipotermia Tópica (HT). Provavelmente o PCI seja o método de citoproteção mais estudado até o momento e postula-se que a redução do estresse oxidativo seja o principal mecanismo relacionado aos efeitos protetores conhecidos, seja pela ativação de genes específicos e produção de enzimas antioxidantes, seja pela produção de óxido nítrico, potente vasodilatador com efeito antagonista durante a fase de isquemia do órgão ⁽²⁰⁾. Já a HT tem seu mecanismo de ação relacionado à diminuição da atividade metabólica mitocondrial e supressão da resposta inflamatória ⁽²¹⁾.

2 - Referencial Teórico

2.1 - Fisiopatologia da Isquemia e Reperfusão Hepática

A lesão produzida pela isquemia e reperfusão (IR) resulta inicialmente de um insulto isquêmico por período prolongado, seguido pela fase de restauração do fluxo sanguíneo e reoxigenação do órgão. Ela afeta todas as células dependentes de oxigênio, portanto, todos os tecidos são alvos potenciais da IR ⁽²²⁾. O conceito de lesão por reperfusão, em termos gerais de tecidos ou órgãos, foi inicialmente aventado em 1935 quando foram identificadas anormalidades elétricas como complicações no miocárdio isquêmico por Tennant e colaboradores ⁽²³⁾, mas coube a Hearse e colaboradores em 1975 a primeira utilização do termo “lesão por reperfusão” em experimento com miocárdio canino ⁽²⁴⁾. Este conceito logo se tornou amplamente reconhecido em outros órgãos como sistema nervoso central, pulmão, intestino, músculo esquelético, rim e fígado ⁽²⁵⁾.

No fígado, esta forma de lesão foi reconhecida como um distúrbio patológico clinicamente relevante, complicando transplantes hepáticos experimentais, ainda em 1975 por Toledo-Pereyra e colaboradores, identificando congestão, trombose progressiva e necrose do enxerto com consequente falência orgânica ⁽²⁶⁾.

A IR é, de forma simplificada, um fenômeno bifásico, sendo a primeira fase relacionada à isquemia propriamente dita e estendendo-se pelas primeiras 06 horas de reperfusão ⁽²⁷⁾, quando ocorre sucessivamente a hipóxia tecidual, metabolismo anaeróbico, acidose e produção de xantina oxidase e NADP (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) oxidase pelos hepatócitos, levando a geração e acúmulo de ERO e ERN, seguido pela reperfusão inicial com edema celular secundário aos distúrbios nos mecanismos de transporte ativo de íons Na⁺ e Ca⁺, além da ativação das células de Kupffer. Na segunda fase, com pico de ação em torno de 24 horas de pós reperfusão, seguem os danos provocados pela recirculação do órgão e o aporte de oxigênio e se somam o processo inflamatório e imunológico relacionado à síntese de citocinas ⁽²⁸⁾ e outros mecanismos inflamatórios. Esta última etapa acaba por acentuar os danos iniciados anteriormente e envolve interações entre os hepatócitos, endotélio sinusoidal, células de Kupffer, neutrófilos, macrófagos, células NK e plaquetas ^(29, 30) (Figura 1).

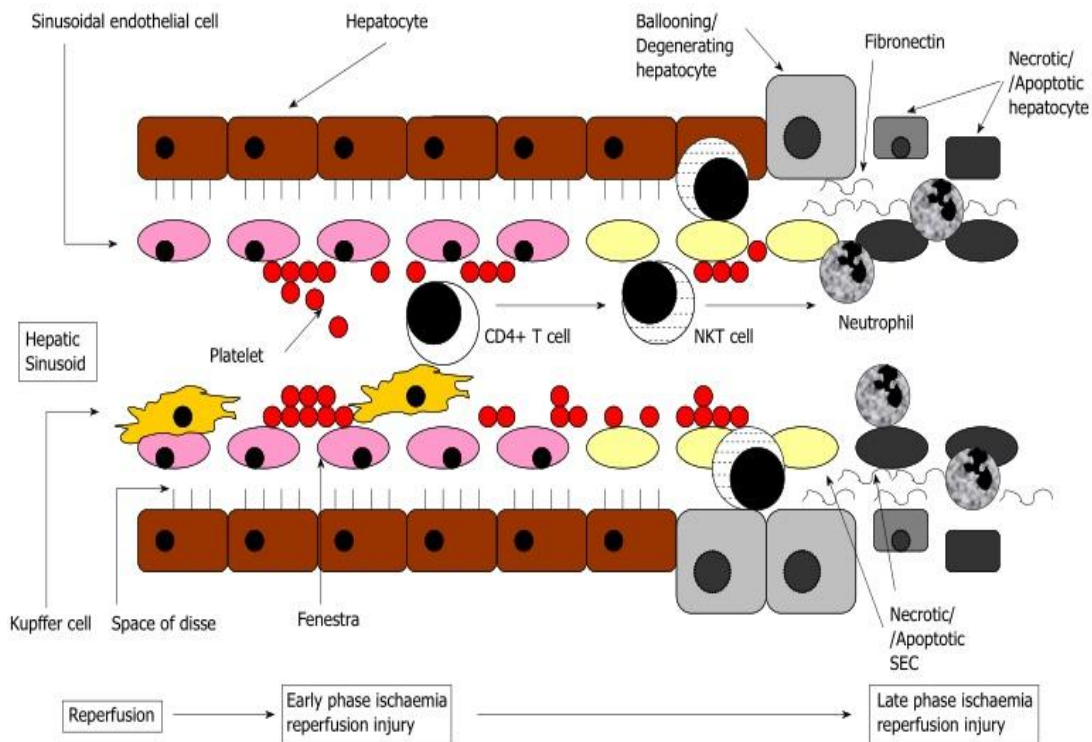


Figura 01: Diagrama esquemático dos mecanismos celulares de lesão na IRH dentro de um sinusóide hepático e área circundante, demonstrando falha inicial de perfusão sinusoidal por agregação de plaquetas, mobilização das células de Kupffer que ativam linfócitos CD4 e células NK que causam destruição de células endoteliais sinusoidais e de hepatócitos, seguido de ativação, adesão e transmigração de neutrófilos causando ainda mais lesão celular. Extraído de Datta G, 2013.

Os hepatócitos têm especial sensibilidade durante a fase isquêmica, uma vez que a hipóxia produz uma diminuição do fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, levando à depleção do ATP celular, aumento na formação de lactato e distúrbios na homeostase de H^+ , Na^+ e Ca^{++} , que leva a processo de aumento da permeabilidade e desorganização mitocondrial com formação de poros nesta organela, liberando então a proteína SMAC/DIABLO⁽³¹⁾ (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitors of apoptosis-binding protein with low isoelectric point), ativadora do sistema de enzimas caspase, sendo este um evento fatal para o hepatócito, com consequente apoptose (Figura 2)⁽³²⁾. Ainda nesta fase inicial, ocorre um aumento

da Adenosina Monofosfato (AMP) e consequente desregulação das enzimas que atuam no controle do metabolismo da glicose^(33, 34).

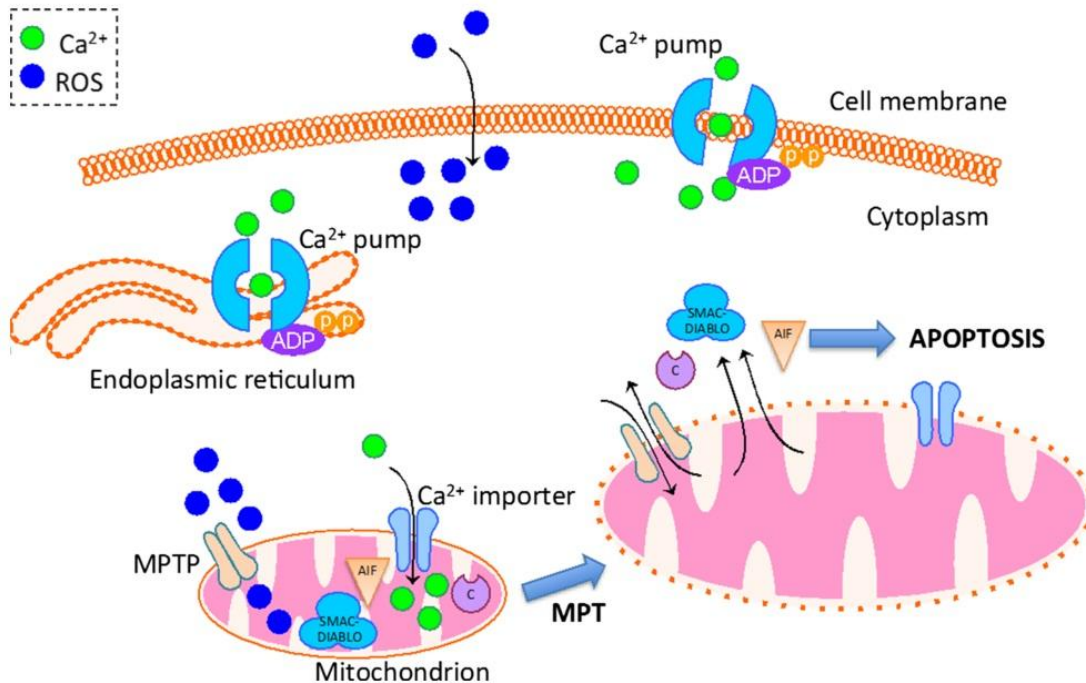


Figura 02: Resumo dos mecanismos intracelulares envolvidos na IRH. Legenda: MPTP= poro de transição de permeabilidade mitocondrial, MPT= transição de permeabilidade mitocondrial, SMAC/DIABLO= segundo ativador de caspase derivado das mitocôndrias, AIF= fator indutor de apoptose, C= citocromo, ADP= difosfato de adenosina, ROS= espécies reativas de oxigênio. Extraído de Quesnelle KM, 2015.

Consequentemente, a falta de substrato energético interfere com o transporte ativo da membrana celular, produzindo edema nas células endoteliais sinusoidais e nas células de Kupffer. Isto somado ao desequilíbrio entre baixos níveis de óxido nítrico (ON) e elevados níveis de endotelina e tromboxane, levam ao estreitamento do lúmen sinusoidal, prejudicando a microcirculação⁽³⁵⁻³⁷⁾. Os baixos níveis de ON derivam da diminuição na produção e também pela reação com espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo assim responsáveis pela modulação da intensidade da lesão da IRH, pois regulam a adesão neutrofilica, a agregação plaquetária e a contração das células perissinusoidais (células hepáticas estreladas)⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

Na segunda fase, o dano produzido pela reperfusão hepática deriva principalmente de ERO geradas com a reoxigenação dos tecidos isquêmicos durante a primeira fase, sendo que a origem destas moléculas intra e extracelulares são as mitocôndrias dos hepatócitos. As células endoteliais dos sinusoides hepáticos têm importante função na homeostase local, controlando o tônus vascular e a eliminação de toxinas, sendo particularmente vulneráveis à lesão pela IRH. O efeito da IRH nestas células produz descontinuidades da membrana celular, vacuolização da membrana nuclear e deformidade celular, com conseqüente prejuízo da microcirculação, adesão de plaquetas, vasoconstrição local, ativação das células de Kupffer, infiltração de neutrófilos e morte de hepatócitos ^(41, 42). Evidências recentes apontam ainda que as células endoteliais sinusoidais perdem sua função e estrutura por falta de estímulo biomecânico durante a fase de isquemia ⁽⁴³⁾. Elas têm ainda suas funções prejudicadas no que se refere à transcrição de genes específicos ⁽⁴⁴⁾ relacionados à produção endotelial de citoprotetores como ON, trombosmodulina (molécula antitrombótica) e fatores antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e heme oxigenase ⁽⁴⁵⁾. O gene Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) é o principal envolvido na ativação de outros genes, detoxificação, produção de antioxidantes e citoprotetores citados ⁽⁴⁶⁾.

Paralelamente a lesão das células endoteliais, ocorre ativação das células de Kupffer, com conseqüente liberação adicional de ERO e de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-22 e interferon γ ⁽⁴⁷⁻⁵²⁾. Estas moléculas, por sua vez, induzem adesão de neutrófilos e síntese de IL-8 com conseqüente quimiotaxia e infiltração neutrofílica intraparenquimatosa ainda maior, efeito este provocado pelo aumento da síntese de moléculas de adesão pelas células endoteliais sinusoidais como molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), VCAM-1, selectina e integrina ⁽⁵³⁾. Estas citocinas amplificam a atividade da célula de Kupffer, promovendo assim um recrutamento neutrofílico adicional e aderência aos sinusoides hepáticos

⁽⁵⁴⁾. Além da produção destas citocinas quimiotáticas, as plaquetas aderem aos sinusoides e induzem a morte de células endoteliais pela produção de peroxinitrito (ONOO^-), um tipo de espécie reativa de nitrogênio (ERN) derivado do óxido nítrico e que tem elevada citotoxicidade ⁽⁵⁵⁾. O perfil de ativação e efeitos biológicos das citocinas citadas já foram extensamente investigados e detalhados ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾, com estudos inclusive em humanos que estabeleceram um padrão de ativação e comportamento das citocinas desde o momento do procedimento cirúrgico inicial, sugerindo que exista um perfil imunofenotípico prévio relacionado à maior ocorrência de IRH nos casos de transplante hepático, sendo esta assinatura imunológica relacionada a eventos como infecções, alergias, autoimunidade, câncer e até inflamações estéreis ⁽⁶⁰⁻⁶³⁾.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) descritas levam a morte do hepatócito com liberação de componentes celulares conhecidos como DAMPs (damage associated molecular patterns) na circulação com consequente imunoestimulação adicional, especialmente para as células de Kupffer e aumento na síntese de citocinas inflamatórias já descritas, levando por sua vez a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, com conhecida capacidade de gerar ainda mais ERO e ERN, com progressivo aumento deste quadro inflamatório estéril hepático ⁽⁶⁴⁾. Entre os DAMPs mais estudados até o momento incluem-se: HMGB1 (High Mobility Group Box 1), proteínas S-100, Heat Shock Protein (HSP), hialuronato, proteína surfactante, interferon alfa, ácido úrico, fibronectina, defensina beta e cardiolipina ⁽⁶⁵⁾. Os DAMPs gerados levam a ativação, nos leucócitos e nas células parenquimatosas, de receptores específicos do sistema imune inato, produzindo então complexos moleculares intracelulares conhecidos como inflamossomas ⁽⁶⁶⁾, que servem de plataforma de ativação da enzima caspase tipo 1, que induz fundamentalmente a ativação de IL-1 e suas propriedades inflamatórias conhecidas e implicadas na IRH ^(67, 68).

Outras situações clínicas, como a esteatose hepática, acentuam esta interação descrita entre as células de Kupffer e as plaquetas, tendo como consequência uma acentuação dos danos na microcirculação ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Sabe-se também que fígados com níveis moderados (de 30% a 60%) e graves (mais de 60%) de esteatose estão associados a lesões importantes pela IRH, enquanto fígados com esteatose leve (menos de 30%) sofrem lesões semelhantes aos fígados normais ^(72, 73). Situações clínicas com colestase ^(74, 75) associada e diabetes ⁽⁷⁶⁾ também estão associadas à amplificação das lesões provocadas pela IRH. Todas estas condições patológicas descritas têm em comuns dois agentes principais, independente de sua etiologia: o estresse oxidativo e o processo inflamatório ⁽⁷⁷⁾.

Alguns relatos apontam que as células de Kupffer não seriam a única fonte de TNF- α durante a IRH, baseando-se em evidências obtidas em estudos com animais em que estas células foram inativadas e ainda assim foram encontrados elevados níveis desta citocina ^(78, 79). Outros estudos também demonstraram que a simples manipulação hepática, sem oclusão vascular ou secção parenquimatosa, já é responsável por intensa reação inflamatória sistêmica, indicando que o momento de eventuais intervenções com objetivo citoprotetor deve ser o mais precoce possível ⁽⁸⁰⁾.

Outro mecanismo de lesão celular envolvido na IRH ocorre através do sistema do complemento, com ativação de suas vias clássica e alternativa, decorrente da estimulação por citocinas produzidas (TNF- α principalmente), proteínas intracelulares liberadas e também pelo efeito de espécies reativas de oxigênio (ERO), com consequente produção final do “complexo de ataque a membranas”, que por sua vez induz ativação neutrofílica adicional, vasoconstrição, prejuízo da microcirculação, aumento da permeabilidade vascular e, por fim, lise celular hepatocitária ⁽⁸¹⁾.

Outra classe de mediadores em estudo são as sirtuínas, moléculas envolvidas na regulação de vários processos de transcrição gênica e resposta metabólica ao estresse, sendo as variantes 1 e 3 destas substâncias as mais estudadas até o momento nos processos de IRH ⁽⁸²⁾. Marcadores como a Gama Glutamil Transpeptidase (GGT) também já foram objeto de estudos ⁽⁸³⁾, sugerindo que níveis elevados desta enzima estariam associados a efeitos citoprotetores e melhores desfechos clínicos ⁽⁸⁴⁾.

A resposta dos hepatócitos a lesão hepática provocada é a proliferação e consequente hipertrofia compensatória para retornar ao estado de homeostase ⁽⁸⁵⁾. Esta sequência regenerativa pode ser prejudicada por drogas, infecções virais, toxinas e carcinogênicos, levando então ao estado de insuficiência hepática, inclusive com ativação de células-tronco locais (células ovais em roedores) na tentativa de se diferenciar em hepatócitos e repor a massa perdida, podendo levar a formação de fibrose orgânica também ⁽⁸⁶⁾.

2.2 - Mecanismos de Proteção contra os efeitos da IRH

Múltiplas estratégias têm sido estudadas com objetivo de diminuir os efeitos da IRH. Dentre estas, estão medidas farmacológicas (drogas com efeitos citoprotetores), cirúrgicas (condicionamento local pré e pós-evento isquêmico, condicionamento remoto) e diminuição do consumo metabólico local através da hipotermia tópica e sistêmica ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾.

2.2.1 - Terapias Farmacológicas da IRH

Inúmeras substâncias já foram testadas em situações de IR. Sabe-se que o uso de anestésicos voláteis, como o propofol, isoflurano e sevoflurano provocam efeito semelhante ao pré-condicionamento isquêmico, situação conhecida como pré-condicionamento anestésico ^(90, 91). O mecanismo de proteção tem origem na regulação prévia de sistemas antioxidantes, provocando diminuição dos efeitos da reperfusão subsequente ^(92, 93). Outra terapia farmacológica descrita utiliza reposição de antioxidantes. Entre estes, a glutatona exerce um papel fundamental e sua depleção é observada nas lesões hepáticas agudas por intoxicação com acetaminofeno. Seus níveis podem ser ajustados por administração direta ou pelo uso de n-acetilcisteína, obtendo-se efeitos protetores sobre os danos de IRH ⁽⁹⁴⁾. Algumas substâncias agonistas dos receptores A2 da adenosina e do peptídeo atrial natriurético simulam o efeito protetor do PCI ⁽⁹⁵⁾.

Existe ainda na literatura extensa lista de fármacos testados no controle dos efeitos da IRH (tabela 1), sendo seus benefícios e aplicabilidade questionáveis nos cenários clínicos usuais de IRH ^(96, 97).

Tabela 1: Outras Substâncias Testadas no Controle da IRH

Acido oleanólico ⁽⁹⁸⁾	Crocetina ^(99, 100)	L-Arginina ⁽¹⁰¹⁾
Acido Salvianólico tipo B ⁽¹⁰²⁾	Depletore ou inibidores do sistema do complemento ("cobra venom factor", CVF) ⁽¹⁰³⁾	Liraglutida ⁽¹⁰⁴⁾
AICAR, estimulador da enzima proteína quinase ativada pela AMP (AMPK) ⁽¹⁰⁵⁾	Diannexin ⁽¹⁰⁶⁾	Losartana potássica ⁽¹⁰⁷⁾
Alopurinol ⁽⁹⁴⁾	Enzima Catalase ⁽⁹⁴⁾	Monóxido de Carbono ^(108, 109)
Análogos sintéticos da peroxidase da glutathione ⁽¹¹⁰⁾	Enzima Superóxido Dismutase ⁽⁹⁴⁾	Nanopartículas de óxido de cério (CeO ₂) ⁽¹¹¹⁾
Anetol ⁽¹¹²⁾	Espironolactona ⁽¹¹³⁾	Parecoxibe sódico ⁽¹¹⁴⁾
Bloqueadores de canais de cálcio ⁽¹¹⁵⁾	Estimulantes da proteína quinase tipo B (relacionado ao gene AKT): fatores de crescimento epidérmico, de plaquetas, de fibroblastos e de endotélio vascular ⁽¹¹⁶⁾	Prostaglandina E1 ⁽¹¹⁷⁾
Bortezomibe ⁽¹¹⁸⁾	Estimulantes do gene Nrf2: CDDO-imidazolidine ⁽¹¹⁹⁾ , dh404 ⁽¹²⁰⁾	Rebamipida ⁽¹²¹⁾
Bromelaína ⁽¹²²⁾	Ficocianina ⁽¹²³⁾	Reparixina ⁽¹²⁴⁾
Canabidiol ⁽¹²⁵⁾	Flavonoides: Rosa Laevigata ⁽¹²⁶⁾ , Silibinina ^(127, 128) , Breviscapina ⁽¹²⁹⁾ , Quercetina ^(130, 131)	Serelaxin ^(132, 133)
Cilostazol ⁽¹³⁴⁾	Fumarato de dimetilo ⁽¹³⁵⁾	Sinvastatina ⁽¹³⁶⁾
Citrato de sildenafil ⁽¹³⁷⁾	Geniposide ⁽¹³⁸⁾	Sulfeto de Hidrogênio ⁽¹³⁹⁾
Cloridrato de dexmedetomidina ^(140, 141)	Glicina ⁽¹⁴²⁾	Suplementação de ON endógeno (terapia inalatória ou administração parenteral de nitritos) ^(143, 144)
Cloridrato de minociclina ⁽¹⁴⁵⁾	Hormônios Esteroides ⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁹⁾	Terapia de ativação gênica com vírus modificado ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾
Cloridrato de tramadol ⁽¹⁵³⁾	Inibidores da Caspase ⁽¹⁵⁴⁾	Tocoferol Alfa ⁽⁹⁴⁾

2.2.2 - Terapias Cirúrgicas da IRH

O Condicionamento Isquêmico (CI) é uma estratégia bem documentada para atenuar os efeitos da IRH⁽¹⁵⁵⁾, sendo o Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI) do fígado um dos mecanismos protetores mais estudados⁽¹⁵⁶⁾. Sua aplicação é usualmente realizada em etapa imediatamente anterior ao período isquêmico programado para o órgão estudado e consiste na oclusão por curto intervalo de tempo (10 minutos) de seu suprimento sanguíneo seguida de mesmo tempo de liberação do fluxo⁽¹⁵⁷⁾. Suas origens remontam a 1986 quando Murry e colaboradores⁽¹⁵⁸⁾ reportaram pioneiramente o efeito cardioprotetor que breves períodos de isquemia e reperfusão produziam sobre a área de infarto miocárdico em modelo experimental

animal, demonstrando enfim uma teoria proposta previamente em 1972 por Braunwald e colaboradores ⁽¹⁵⁹⁾ de que a lesão isquêmica poderia ser reduzida. Posteriormente suas aplicações foram ampliadas para outros órgãos e sistemas, produzindo extensa literatura relacionada às suas potenciais aplicações clínicas ⁽¹⁶⁰⁾. Postula-se que seus efeitos derivam dos baixos níveis de estresse oxidativo produzido e consequente ativação gênica ⁽¹⁶¹⁾ com estímulo da enzima proteína quinase ativada pela AMP (AMPK) ⁽¹⁶²⁾ com indução de elevação nos níveis de ON ⁽¹⁶³⁾ e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase ⁽¹⁶⁴⁾, com consequente diminuição dos níveis intracelulares de superóxido e subsequente diminuição da produção no núcleo celular de HMGB1 (via inibição da enzima nuclear histona deacetilase), espécie de DAMP que, se secretada para o meio extracelular, seria responsável por recrutar a resposta imune estéril conhecida, além de estimular a síntese de TNF- α via elevação dos níveis do fator de transcrição NF-kappaB (Figura 3) ⁽¹⁶⁵⁾. Além da fase pré-insulto, o pós-condicionamento isquêmico também se baseia na mesma sequência de ativação gênica e suas consequências benéficas ⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁹⁾. Deve ser destacado também que estudos randomizados em humanos falharam em demonstrar estes efeitos benéficos do PCI identificados em modelos experimentais ⁽¹⁷⁰⁻¹⁷²⁾.

Além destas formas diretas, de aplicação local do PCI, ou seja, sobre o órgão em estudo, existem evidências do mesmo efeito com o PCI remoto, onde a aplicação sobre um órgão ou segmento resulta em proteção de outro ⁽¹⁷³⁻¹⁷⁷⁾. Associada a estas formas de CI descritas, há relatos promissores da associação com reperfusão hipoxêmica combinada com PCI, controlando ainda mais os efeitos da IRH ⁽¹⁷⁸⁾.

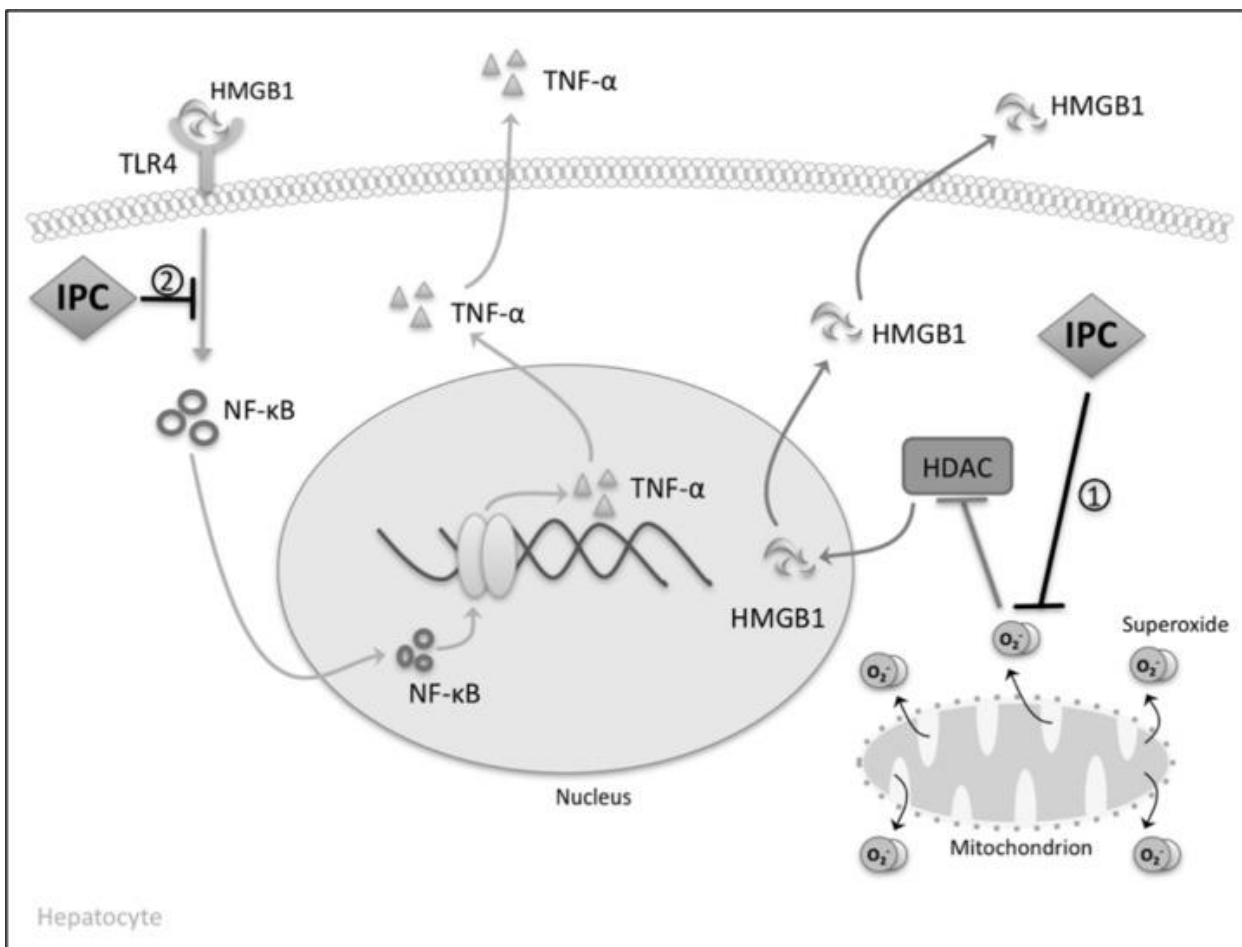


Figura 03: Mecanismos de ação do PCI. Legenda: IPC= pré-condicionamento isquêmico, HMGB1= high mobility group box 1, TLR4= receptor toll-like 4, HDAC= enzima nuclear histona deacetilase, TNF- α = fator de necrose tumoral alfa, NF- κ B= fator de transcrição nuclear kappa B. Extraído de Bystrom P, 2017.

Estudos em animais já demonstraram efeito protetor do PCI em insultos isquêmicos de até 60 minutos, inclusive em fígados esteatóticos ⁽¹⁷⁹⁾, conhecidamente mais suscetíveis aos efeitos nocivos da isquemia e reperfusão ⁽¹⁸⁰⁾. Evidências em estudos com animais apontam para uma redução na infiltração leucocitária, redução da liberação enzimática hepática e na diminuição da apoptose celular como os mecanismos responsáveis para este efeito protetor ⁽¹⁸¹⁾. Evidências apontam que substâncias citadas anteriormente como adenosina e ON em níveis elevados têm sido citadas como principais agentes envolvidos no PCI hepático, iniciando minutos após o início da fase de condicionamento do órgão ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁶⁾.

Formas alternativas de controle cirúrgico vascular hepático, já comparadas às técnicas de CI e sem evidencia de superioridade, incluem ainda o clampeamento intermitente do pedículo hepático ^(187, 188) e também a oclusão seletiva da veia porta sem incluir a artéria hepática ⁽¹⁸⁹⁻¹⁹²⁾, este ainda em fase de estudos experimentais ⁽¹⁹³⁾.

Além destas formas e associações descritas, existe também estudo sobre o efeito hepatoprotetor do PCI remoto ligado a estimulação térmica cutânea em modelo animal ⁽¹⁹⁴⁾, em que a prévia estimulação de determinada região torácica com fonte de calor produz efeitos condicionantes sobre a resposta a IRH subsequente.

2.2.3 - Terapia Hipotérmica da IRH

Outra forma de se inibir os efeitos da IR é ajustar o desequilíbrio entre a oferta e a demanda de substratos celulares, que é característico da IRH, diminuindo então as necessidades metabólicas do fígado em situações de estresse através do uso da hipotermia ⁽¹⁹⁵⁻¹⁹⁷⁾. Historicamente as publicações sobre o uso da hipotermia na preservação de órgãos e tecidos datam ainda de 1938, com registros do efeito protetor em membros isquêmicos com torniquetes ⁽¹⁹⁸⁾, passando pelos estudos experimentais de Bigelow e colaboradores ⁽¹⁹⁹⁾ em 1950 e chegando até 1953 no uso clínico original durante reparo intra-atrial de defeito septal cardíaco ⁽²⁰⁰⁾. No campo da hepatocirurgia os experimentos com hipotermia remontam aos estudos em cães de Raffuci e colaboradores em 1953 ⁽²⁰¹⁾, demonstrando inicialmente que o fígado poderia tolerar 20 minutos de isquemia normotérmica (IN) e que este tempo poderia então ser ampliado para 60 minutos com aplicação de hipotermia sistêmica. Em 1957 Graydon e colaboradores ⁽²⁰²⁾ relataram variações nas técnicas de oclusões vasculares hepáticas associadas à aplicação de hipotermia. Coube a Longmire e colaboradores em 1961 ⁽²⁰³⁾ o relato original da primeira série de 09 hepatectomias com uso de hipotermia sistêmica de até 30 °C em 05 destes casos.

De acordo com a equação de Arrhenius, a taxa metabólica celular é reduzida em 50% a cada queda de 10 °C da temperatura ⁽²⁰⁴⁾. Baseando-se neste princípio, a hipotermia, com seu consequente hipometabolismo, tem sido utilizada para proteção de enxertos hepáticos por períodos extensos de isquemia possibilitando a realização de transplantes. Todavia, o fígado ainda pode ser submetido ao processo de esfriamento em hepatectomias parciais através de perfusão transoperatória hipotérmica “in situ” ^(205, 206) e também por aplicação tópica superficial sobre o órgão ⁽²⁰⁷⁻²¹¹⁾. A supressão da atividade metabólica mitocondrial é parte fundamental do efeito citoprotetor da hipotermia, efeito já demonstrado em estudos animais com diminuição dos achados relativos à necrose hepatocelular, níveis séricos de AST, ALT e infiltração de neutrófilos ⁽²¹²⁾, sendo o nível de proteção ótimo quando se resfria o fígado de 26 °C a 28 °C, enquanto níveis de temperatura ainda menores não conferem proteção adicional ao órgão ^(213, 214). Estudo de Heijnen e colaboradores ⁽²¹⁵⁾ demonstrou que a variação de somente um grau na temperatura corporal basal de ratos submetidos a protocolo de IRH pode determinar importantes diferenças em marcadores bioquímicos e histológicos.

O resultado final, obtido através da diminuição do consumo energético pela indução da hipotermia, é a preservação dos estoques de ATP celular, quando comparado a situações de isquemia normotérmica ⁽²¹⁶⁾. Através desta ferramenta, é possível corrigir parcialmente o desequilíbrio entre a oferta e a demanda energética celular, fazendo com que o fígado possa manter e usar suas reservas energéticas por períodos maiores de metabolismo anaeróbico, diminuindo a acidose local, preservando os níveis de antioxidantes, inibindo a formação de ERO+ERN e todos seus efeitos deletérios sobre a homeostase ⁽²¹⁷⁻²²⁰⁾.

A hipotermia provoca intenso efeito imunomodulador. Este efeito foi observado em estudos animais, onde se constatou redução de até 99% do infiltrado neutrofílico hepático após a reperfunção, quando comparado a situações normotérmicas ⁽²²¹⁾. Níveis reduzidos de TNF- α , IL-1

e IL-6, conhecidos quimiotáticos, bem como aumento dos níveis de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins), com seus conhecidos efeitos anti-inflamatórios e inibidores de morte celular ⁽²²²⁾, são encontrados em situações de hipotermia, conferindo imunorregulação adicional. Foi também demonstrado que níveis do fator de transcrição NF-kappaB também estão elevados associados à indução de hipotermia ⁽²²³⁾ e isto pode conferir um efeito protetor adicional, além da inibição dos mecanismos envolvidos no processo de apoptose celular, tanto intrínsecos (manutenção de estoques de ATP, controle do influxo iônico mitocondrial impedindo a ruptura da organela e elevando níveis de ON e de glutathiona com consequente bloqueio do acúmulo de peróxido de hidrogênio) como extrínsecos (inibição da afinidade dos receptores de membrana celular levando a inibição do sistema enzimático apoptótico das caspases e da transcrição do fator nuclear kappa B, relacionado a inibição da síntese de ON) (Figura 04) ⁽²²⁴⁾. Outro efeito positivo observado com a hipotermia hepática é a diminuição da resistência insulínica no fígado, o que contribui para um melhor controle glicêmico e redução de corpos cetônicos, distúrbios estes comuns em situações de lesão hepática aguda e cuja consequente diminuição da morbidade relacionada à hiperglicemia pós-operatória já foi observada em modelos experimentais ⁽²²⁵⁾.

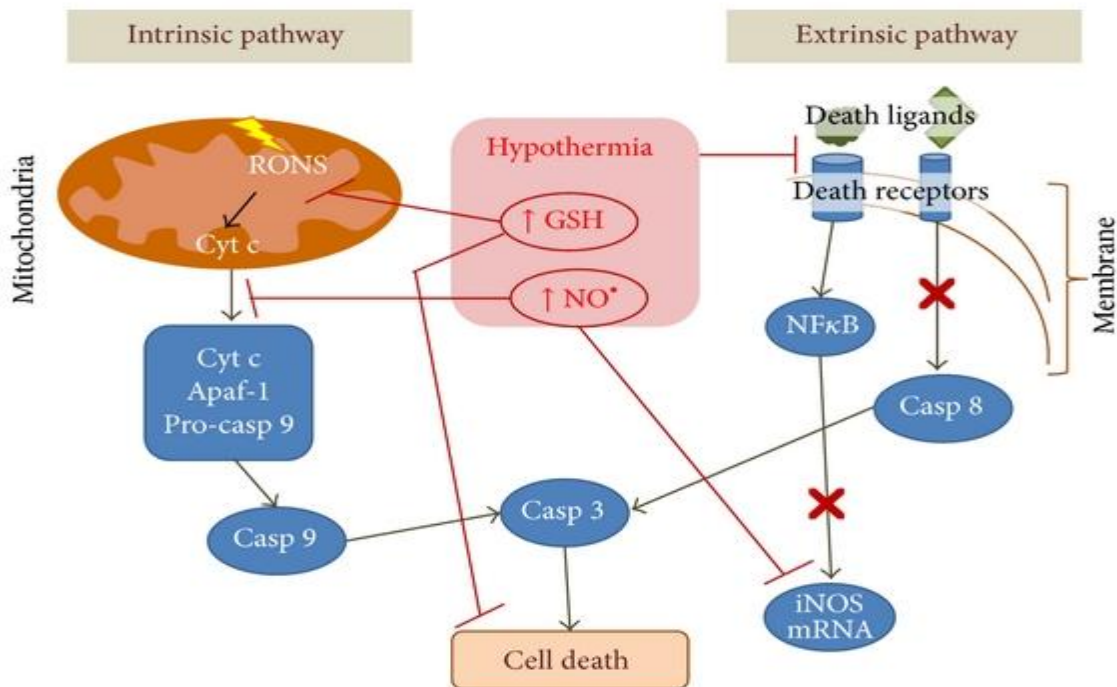


Figura 04: Mecanismos de modulação da apoptose pela hipotermia, intrínsecos e extrínsecos. RONS= espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, Cyt c= citocromo mitocondrial, Casp= enzimas do sistema das caspases, GSH= glutatona, NFκB= fator nuclear kappa B, NO= óxido nítrico, iNOS= enzima óxido nítrico sintase induzível. Extraído de Alva N, 2013.

Existem ainda técnicas de perfusão hipotérmica, que isolam o fígado hipotérmico dos demais órgãos e da circulação sistêmica ⁽²²⁶⁾. Para obter tal resultado, utiliza-se a técnica de exclusão vascular total do órgão. Esta técnica inclui, além da perfusão hipotérmica hepática isolada, o clampeamento da veia cava supra e infra-hepática e os vasos do pedículo hepático. Em virtude de sua complexidade, esta técnica tem sido usada somente em hepatectomias extensas, com invasão da confluência das veias hepáticas ou da veia cava ^(227, 228).

Embora controverso, tem sido demonstrado que a hipotermia sistêmica pode ter efeitos deletérios, como arritmias cardíacas, coagulopatia e aumento das taxas de infecção. Entretanto, experimentos que utilizaram hipotermia sistêmica leve (temperaturas corporais entre 34 °C e 36 °C), produzida de forma passiva durante o período de isquemia transoperatória, demonstraram efeitos protetores ⁽²²⁹⁾. Neste sentido, Xiao e colaboradores ⁽²³⁰⁾ realizaram experimento de pré-

hipotermia sistêmica a 32 °C com 02 horas de duração seguida de 60 minutos de isquemia hepática parcial normotérmica demonstrando efeitos benéficos sobre marcadores de lesão celular, apoptose celular e também sobre a atividade inflamatória com redução nos níveis de TNF- α e IL-1. Evidenciou ainda que o uso de agente farmacológico Ly294002 com bloqueio do mediador celular PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) inibiu os efeitos protetores da hipotermia, demonstrando então que este sistema de sinalização celular, sabidamente relacionado a outros processos celulares, como proliferação, diferenciação e quiescência, também é fundamental para se obter os efeitos benéficos conhecidos da hipotermia. Wang e colaboradores ⁽²³¹⁾ também relataram experimento de pré-hipotermia sistêmica a 32 °C por 02 horas, seguido de 60 minutos de isquemia hepática parcial e reperfusão por 06 horas, identificando então que os animais submetidos a hipotermia obtiveram melhores resultados bioquímicos, histológicos e também nos marcadores de apoptose. Também Alva e colaboradores ⁽²³²⁾ relataram experimento de pré-condicionamento hipotérmico hepático em modelo animal ex vivo, aplicando perfusão hipotérmica a 22 °C por 10 minutos seguida de mais 10 minutos de perfusão a 37 °C e período de isquemia de 40 minutos, demonstrando então efeitos benéficos desta forma de condicionamento sobre marcadores celulares (ALT, LDH), níveis de peroxidação lipídica, níveis de glutathione além de manutenção da integridade histológica quando comparados aos controles normotérmicos. Estes autores citados acima demonstraram que a hipotermia também pode ser usada para pré-condicionar o fígado a tolerar de forma melhor os períodos subsequentes de isquemia e reperfusão.

Em situações de transplante hepático, o uso de soluções de preservação hipotérmicas, entre 0 °C e 4 °C, reduz o metabolismo a aproximadamente 5% do basal, mantendo o órgão viável por até 15 a 18 horas ⁽²³³⁾, porém segue havendo metabolismo anaeróbico no órgão e consequente acidificação do meio, com suas consequências conhecidas: sensibilização de células

endoteliais e do epitélio biliar, morte celular endotelial e do colangiócito, aumentando o risco de estenoses tardias da via biliar⁽²³⁴⁾. Alternativas como bombas de perfusão hipo e normotérmica do enxerto têm surgido, ainda em caráter experimental^(235, 236), na tentativa de preservar melhor enxertos marginais ou aqueles obtidos com doador em parada cardíaca controlada. Em combinação com hipotermia local da solução de preservação, podem oferecer efeitos sinérgicos (hipotermia tópica e perfusional) para a proteção do órgão transplantado⁽²³⁷⁾. Neste cenário de preservação de enxertos, o uso de substâncias como a melatonina^(238, 239), bem como de soluções enriquecidas em hidrogênio^(240, 241), na solução hipotérmica, já demonstrou melhora da função mitocondrial em estudos com animais durante a reperfusão hepática.

2.2.4 - Terapia Combinada da Hipotermia com o Condicionamento Isquêmico

A aplicação tópica da hipotermia, isolada ou em conjunto com PCI, foi previamente avaliada pelo nosso grupo em um modelo animal de isquemia hepática parcial (70% do órgão), o qual utilizou 90 minutos de isquemia seguido de reperfusão de 120 minutos e eutanásia. Foram demonstrados naquele modelo agudo os efeitos protetores da hipotermia tópica a 26 °C pela redução dos níveis dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 e pelo aumento de citocina anti-inflamatória IL-10, aumento dos níveis de ON, bem como elevação dos níveis de expressão dos genes Nrf2, Keap1 e NQO1, todos relacionados a efeitos antioxidantes⁽²⁴²⁻²⁴⁵⁾. A ausência do efeito protetor do PCI naqueles estudos com lesão aguda por IRH, na opinião dos autores, se deve ao grau extremo de lesão produzida pelo modelo em uso. Modelos com isquemia hepática total, embora com maior representatividade clínica no que se refere a semelhança com um transplante⁽²⁴⁶⁾, têm mortalidade elevada, mesmo com tempos de isquemia menores⁽²⁴⁷⁻²⁴⁹⁾. Já o modelo adotado, em nosso estudo prévio, de isquemia parcial com 90 minutos de duração está associado a graves lesões histopatológicas e bioquímicas^(250, 251), servindo de base para diversas pesquisas relacionadas à IRH.

Modificações foram desenvolvidas a partir da técnica original daquele modelo de isquemia parcial, especialmente relacionadas ao método anestésico ⁽²⁵²⁾, incisão cirúrgica e cuidados trans e pós-operatórios, permitindo assim obter um modelo experimental com tempo de observação estendido de 24 horas de pós reperfusão, possibilitando analisar tardiamente os efeitos dos diferentes métodos de citoproteção (PCI e HT), comparando-os entre si. A aplicação combinada destas técnicas, PCI e HT, em um modelo com este tempo de duração, tanto de isquemia como de reperfusão, não foi descrita até o momento e se justifica plenamente considerando o platô terapêutico atingido no que refere à busca de opções comprovadamente efetivas em relação ao controle da IRH experimental, mas com grande chance de aplicabilidade clínica, sendo este possivelmente o ponto crítico dos estudos atuais relacionados à IRH: a aplicação e a reprodução dos estudos experimentais em modelos clínicos assistenciais ⁽²⁵³⁻²⁵⁷⁾.

Objetivos

Principais

- 1- Avaliar a viabilidade do modelo estendido de IRH com 24 horas de reperfusão após 90 minutos de isquemia com aplicação combinada ou isolada de diferentes métodos de citoproteção
- 2- Avaliação bioquímica sérica em 24 horas de reperfusão dos marcadores de lesão hepatocelular usuais ⁽²⁵⁸⁾: Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Amônia (AMO), Bilirrubina Total (BT) e Bilirrubina Direta (BD), Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transpeptidase (GGT), Glicose (GLI), Lactato (LAC) e Lactato Desidrogenase (LDH).
- 3- Avaliação histopatológica da lesão hepática associada a IR em 24 horas de reperfusão, através de microscopia ótica cegada em lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H&E), usando parâmetros da classificação histopatológica de Suzuki ⁽²⁵⁹⁾ modificada, graduando-se os achados de congestão sinusoidal (CS), degeneração hidrópica (DH), infiltrado leucocitário neutrofílico (ILN) e necrose hepatocelular, sendo acrescentada ainda a estes parâmetros a graduação dos achados de esteatose (E) e também a graduação da zona de necrose foi aprimorada, sendo realizada de forma estratificada, utilizando o princípio de zoneamento hepático descrito por Rappaport em 1954 ^(260, 261) a partir do qual cada lóbulo é dividido em 03 zonas anatômicas e funcionalmente distintas ⁽²⁶²⁻²⁶⁶⁾: Zona 1 (NZ1), partindo da área junto à tríade portal; Zona 2 (NZ2), passando por região intermediária sinusoidal e Zona 3 (NZ3), na região próxima a veia centro lobular. Ao conjunto destes parâmetros histopatológicos aprimorados denominou-se Classificação

Histopatológica de Suzuki Modificada (CHSM). A partir destas graduações, calculou-se o escore de lesão histopatológica (Escore de Suzuki Modificado, ESM) para os lobos isquêmicos, submetidos ou não a HT e/ou PCI e também para os lobos não isquêmicos, servindo de controle pareado.

Secundários

- 1- Correlacionar os escores histopatológicos com os níveis dos marcadores bioquímicos séricos dosados.
- 2- Estabelecer possíveis relações entre o grau de lesão produzida e a eficiência demonstrada pelos métodos de citoproteção utilizados no projeto

Hipótese Conceitual

Os danos teciduais hepáticos provocados pelo processo de isquemia normotérmica e reperfusão em ratos e suas consequências sistêmicas tardias poderiam ser atenuados através do uso de hipotermia hepática in situ a 26 °C isolada ou associada ao pré-condicionamento isquêmico. Postula-se que a utilização de ambas as ferramentas promova ação sinérgica de proteção hepática ampliada.

Referências da Tese

1. Granger D, Kvietys P. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*. 2015;6:524-51.
2. Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, Tsoulfas G. Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury and Trauma: Current Concepts. *Archives of Trauma Research*. 2013;2(2):63-70.
3. Huseyin S, Guclu O, Yuksel V, Erkul GSA, Can N, Turan FN, et al. Avoiding Liver Injury with Papaverine and Ascorbic Acid Due to Infrarenal Cross-Clamping: an Experimental Study. *Brazilian journal of cardiovascular surgery*. 2017;32(3):197-201.
4. Eltzschig H, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*. 2011;17(11):1391-401.
5. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2029-43.
6. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2011;365(12):1118-27.
7. deLemos A, Vagefi P. Expanding the donor pool in liver transplantation: Extended criteria donors. *Clinical Liver Disease*. 2013;2(4):156-9.
8. Pringle J. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Annals of Surgery*. 1908;48(4):541-9.
9. Bismuth H, Eshkenazy R, Arish A. Milestones in the Evolution of Hepatic Surgery. *Rambam Maimonides Medical Journal*. 2011;2(1):1-11.
10. Palladini G, Ferrigno A, Rizzo V, Tarantola E, Bertone V, Freitas I. Lung Matrix Metalloproteinase Activation following Partial Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1-10.
11. Ota S, Yazawa T, Tojo K, Baba Y, Uchiyama M, Goto T, et al. Adrenaline aggravates lung injury caused by liver ischemia-reperfusion and high-tidal-volume ventilation in rats. *Journal of intensive care*. 2016;4:1-7.
12. Freitas SH, Doria RGS, Bueno RS, Rocha WB, Filho JRE, Moraes JRE, et al. Evaluation of potential changes in liver and lung tissue of rats in an ischemia-reperfusion injury model (modified pringle maneuver). *PloS one*. 2017;12(6):1-13.
13. Jochmans I, Meurisse N, Neyrinck A, Verhaegen M, Monbaliu D, Pirenne J. Hepatic ischemia/reperfusion injury associates with acute kidney injury in liver transplantation: Prospective cohort study. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2017;23(5):634-44.
14. Collange O, Charles AL, Lavaux T, Noll E, Bouitbir J, Zoll J, et al. Compartmentalization of Inflammatory Response Following Gut Ischemia Reperfusion. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2015;49(1):60-5.
15. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006;29:113-23.
16. Teoh N, Farrell G. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2003;18(8):891-902.
17. Mendes-Braz M, Elias-Miro M, Jimenez-Castro MB, Casillas-Ramirez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:1-20.

18. Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2004;19:1-12.
19. van Riel W, van Golen R, Reiniers M, Heger M, van Gulik T. How much ischemia can the liver tolerate during resection?. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016;5(1):58-71.
20. Jaeschke H, Woolbright B. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplantation Reviews*. 2012;26(2):103-14.
21. Bilzer M, Gerbes A. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *Journal of Hepatology*. 2000;32(3):508-15.
22. Abu-Amara M, Yang S, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory enetworks-A review. *Liver Transplantation*. 2010;16(9):1016-32.
23. Tennant R, Wiggers C. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *American Heart Journal*. 1935;10(6):843-4.
24. Hearse D, Humphrey S, Chain E. Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1975;7(5):315-8.
25. Teoh N. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2011;26:180-7.
26. Toledo-Pereyra L, Simmons R, Najarian J. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *The American Journal of Surgery*. 1975;129(5):513-7.
27. Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis M, Lykoudis P, Theodoraki K. Global Consequences of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2014:1-13.
28. Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-16.
29. Crockett E, Spielman W, Dowlatshahi S, He J. Sex differences in inflammatory cytokine production in hepatic ischemia-reperfusion. *Journal of Inflammation*. 2006;3(1):1-14.
30. Zimmerman MA, Martin A, Yee J, Schiller J, Hong JC. Natural Killer T Cells in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Clinical Medicine*. 2017;6(4):1-9.
31. Quesnelle K, Bystrom P, Toledo-Pereyra L. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Archives of Toxicology*. 2015;89(5):651-7.
32. Lemasters JJ. Hypoxic, Ischemic and reperfusion injury to liver. In: Arias IM, Boyer JL, editors. *The liver : biology and pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 257-79.
33. Toledo-Pereyra L. Advances in Ischemia and Reperfusion. *Journal of Investigative Surgery*. 2015;28(5):233-5.
34. Behrends M, Martinez-Palli G, Niemann C, Cohen S, Ramachandran R, Hirose R. Acute Hyperglycemia Worsens Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2009;14(3):528-35.
35. Siriussawakul A. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(48):6079-86.
36. Zhang YQ, Ding N, Zeng YF, Xiang YY, Yang MW, Hong FF, et al. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2017;23(14):2505-10.
37. Pannen BH. New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesthesia and analgesia*. 2002;94(6):1448-57.

38. Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013;59(5):1094-106.
39. van Golen R, Reiniers M, Vrisekoop N, Zuurbier C, Olthof P, van Rheenen J. The Mechanisms and Physiological Relevance of Glycocalyx Degradation in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxidants Redox Signaling.* 2014;21(7):1098-118.
40. Talebi Z, Peyvandi H, Dabbagh A. Cellular and Molecular Mechanisms in Perioperative Hepatic Protection: A Review of Current Interventions. *Journal of Cellular & Molecular Anesthesia.* 2017;2(2):82-93.
41. Miyashita T, Nakanuma S, Ahmed A, Makino I, Hayashi H, Oyama K. Ischemia reperfusion-facilitated sinusoidal endothelial cell injury in liver transplantation and the resulting impact of extravasated platelet aggregation. *European Surgery.* 2015;48(2):92-8.
42. Devey L, Ferenbach D, Mohr E, Sangster K, Bellamy CO, Hughes J, et al. Tissue-resident macrophages protect the liver from ischemia reperfusion injury via a heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2009;17(1):65-72.
43. Slegtenhorst B, Dor F, Rodriguez H, Voskuil F, Tullius S. Ischemia/Reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Current Transplantation Reports.* 2014;1(3):147-54.
44. Zabala V, Thevenot P, Cohen A, Gruppuso PA, Sanders JA. Transcriptional Response in a Rat Model of Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *The FASEB Journal.* 2017;31(1_supplement):803-5.
45. Kalogeris T, Baines C, Krenz M, Korthuis R. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology Volume 298.* 2012;298:229-317.
46. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2013;53:401-26.
47. Dello SA, Bloemen JG, van de Poll MC, van Dam RM, Stoot JH, van den Broek MA, et al. Gut and liver handling of interleukin-6 during liver resection in man. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association.* 2011;13(5):324-31.
48. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology.* 2012;56(4):1468-78.
49. Streetz K, Luedde T, Manns M, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut.* 2000;47(2):309-12.
50. Guidi L, Tricerri A, Costanzo M, Adducci E, Ciarniello M, Errani AR, et al. Interleukin-6 release in the hepatic blood outflow during normothermic liver ischaemia in humans. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver.* 2003;35(6):409-15.
51. Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France).* 2001;47(4):661-73.
52. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *The Journal of clinical investigation.* 1990;85(6):1936-43.
53. Coito A. Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2011;16(1):34-40.

54. Frink M, Flohe S, van Griensven M, Mommsen P, Hildebrand F. Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanisms following major challenge. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:1-13.
55. Ben Abdennebi H, Zaouali MA, Alfany-Fernandez I, Tabka D, Rosello-Catafau J. How to protect liver graft with nitric oxide. *World J Gastroenterol.* 2011;17(24):2879-89.
56. Jerin A, Pozar-Lukanovic N, Sojar V, Stanisavljevic D, Paver-Erzen V, Osredkar J. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in liver surgery. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2003;41(7):899-903.
57. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proceedings in Intensive Care & Cardiovascular Anesthesia.* 2010;2(3):161-75.
58. Chestovich PJ, Uchida Y, Chang W, Ajalat M, Lassman C, Sabat R, et al. IL-22: Implications for Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation.* 2012;93(5):485-92.
59. Zhang Y, Wang X, Mao L, Yang D, Gao W, Tian Z, et al. Dual roles of IL-22 at ischemia-reperfusion injury and acute rejection stages of rat allograft liver transplantation. *Oncotarget.* 2017;8(70):115384-97.
60. Sosa R, Zarrinpar A, Rossetti M, Lassman C, Naini B, Datta N, et al. Early cytokine signatures of ischemia/reperfusion injury in human orthotopic liver transplantation. 2016;1(20):1-17.
61. Zhai Y, Shen X-d, Hancock WW, Gao F, Qiao B, Lassman C, et al. CXCR3+ CD4+ T Cells Mediate Innate Immune Function in the Pathophysiology of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *The Journal of Immunology.* 2006;176:6313-22.
62. Lan AK, Luk HN, Goto S, Chen SM, Eng HL, Chen YS, et al. Stress response to hepatectomy in patients with a healthy or a diseased liver. *World journal of surgery.* 2003;27(7):761-4.
63. Badia J, C. Ayton L, J. Evans T, J. Carpenter A, Nawfal G, Kinderman H, et al. Systemic cytokine response to hepatic resections under total vascular exclusion. 1998;164:185-90.
64. van Golen R, Reiniers M, Olthof P, van Gulik T, Heger M. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: Present concepts and potential therapeutics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2013;28(3):394-400.
65. Martin-Murphy B, Holt M, Ju C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicology Letters.* 2010;192(3):387-94.
66. Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunological reviews.* 2011;243(1):152-62.
67. Zhu P, Duan L, Chen J, Xiong A, Xu Q, Zhang H, et al. Gene silencing of NALP3 protects against liver ischemia-reperfusion injury in mice. *Human gene therapy.* 2011;22(7):853-64.
68. Yu SX, Chen W, Hu XZ, Feng SY, Li KY, Qi S, et al. Liver X receptors agonists suppress NLRP3 inflammasome activation. *Cytokine.* 2017;91:30-7.
69. Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, et al. Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver. *Journal of clinical biochemistry and nutrition.* 2011;48(2):142-8.
70. Selzner N, Selzner M, Jochum W, Amann-Vesti B, Graf R, Clavien P-A. Mouse livers with macrosteatosis are more susceptible to normothermic ischemic injury than those with microsteatosis. *Journal of Hepatology.* 2006;44(4):694-701.

71. Anavi S, Madar Z, Tirosh O. Non-alcoholic fatty liver disease, to struggle with the strangle: Oxygen availability in fatty livers. *Redox Biol.* 2017;13:386-92.
72. Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Murata S, et al. Interaction of kupffer cells and platelets determines the severity of ischemia-reperfusion injury in steatosis. *The Tohoku journal of experimental medicine.* 2014;232(2):105-13.
73. Chu MJ, Premkumar R, Hickey AJ, Jiang Y, Delahunt B, Phillips AR, et al. Steatotic livers are susceptible to normothermic ischemia-reperfusion injury from mitochondrial Complex-I dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2016;22(19):4673-84.
74. Kloek J, Levi M, Heger M, van Gouma D, der Loos C, van Gulik T. Cholestasis enhances liver ischemia/reperfusion-induced coagulation activation in rats. *Hepatology Research.* 2010;40(2):204-15.
75. Wiggers JK, van Golen RF, Verheij J, Dekker AM, van Gulik TM, Heger M. Atorvastatin does not protect against ischemia-reperfusion damage in cholestatic rat livers. *BMC surgery.* 2017;17(1):1-8.
76. Zhang Y, Yuan D, Yao W, Zhu Q, Liu Y, Huang F, et al. Hyperglycemia Aggravates Hepatic Ischemia Reperfusion Injury by Inducing Chronic Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-16.
77. Reyes-Gordillo K, Shah R, Muriel P. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Current and future therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2017:1-2.
78. Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Buchler M, Schemmer P, Muller M. Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB surgery : a world journal of hepatic, pancreatic and biliary surgery.* 2012;2012:1-8.
79. Lentsch AB. Regulatory mechanisms of injury and repair after hepatic ischemia/reperfusion. *Scientifica.* 2012;2012:1-14.
80. van de Poll MC, Derikx JP, Buurman WA, Peters WH, Roelofs HM, Wigmore SJ, et al. Liver manipulation causes hepatocyte injury and precedes systemic inflammation in patients undergoing liver resection. *World journal of surgery.* 2007;31(10):2033-8.
81. Heijnen BH, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ, Hack CE, Van Gulik TM. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clinical and experimental immunology.* 2006;143(1):15-23.
82. Pantazi E, Zaouali MA, Bejaoui M, Folch-Puy E, Ben Abdennebi H, Rosello-Catafau J. Role of sirtuins in ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2013;19(43):7594-602.
83. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR, Jr. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res.* 2004;38(6):535-9.
84. Alkozai E, Lisman T, Porte R, Nijsten M. Early elevated serum gamma glutamyl transpeptidase after liver transplantation is associated with better survival. *F1000Research.* 2014;3(85):1-11.
85. Tan EK, Shuh M, Francois-Vaughan H, Sanders JA, Cohen AJ. Negligible Oval Cell Proliferation Following Ischemia-Reperfusion Injury With and Without Partial Hepatectomy. *The Ochsner Journal.* 2017;17(1):31-7.
86. Prieto I, Monsalve M. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning. *Redox Biol.* 2017;12:1020-5.
87. Gurusamy K, Gonzalez H, Davidson B. Current protective strategies in liver surgery. *World Journal of Gastroenterology.* 2010;16(48):6098-103.

88. Cannistra M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *International journal of surgery (London, England)*. 2016;33 Suppl 1:57-70.
89. Saidi RF, Kenari SK. Liver ischemia/reperfusion injury: an overview. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2014;27(6):366-79.
90. Wei L, Chen WY, Hu T, Tang YX, Pan BB, Jin M, et al. Effect and mechanism of propofol in hepatic ischemia/reperfusion injury of rat. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(15):3516-22.
91. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Bonvini JM, Lesurtel M, Ganter M, Weber A, et al. Protection of pharmacological postconditioning in liver surgery: results of a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg*. 2012;256(5):837-44; discussion 44-5.
92. Xu Z, Yu J, Wu J, Qi F, Wang H, Wang Z. The Effects of Two Anesthetics, Propofol and Sevoflurane, on Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;38(4):1631-42.
93. Lv X, Yang L, Tao K, Liu Y, Yang T, Chen G, et al. Isoflurane Preconditioning at Clinically Relevant Doses Induce Protective Effects of Heme Oxygenase-1 on Hepatic Ischemia Reperfusion in Rats. 2011;11(1):1-8.
94. Patel R, Lang J, Smith A, Crawford J, J. Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World*. 2014;6(1):1-8.
95. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999;30(6):1481-9.
96. Abu-Amara M, Gurusamy KS, Glantzounis G, Fuller B, Davidson BR. Pharmacological interventions for ischaemia reperfusion injury in liver resection surgery performed under vascular control. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(4):1-31.
97. Abu-Amara M, Gurusamy K, Hori S, Glantzounis G, Fuller B, Davidson BR. Systematic review of randomized controlled trials of pharmacological interventions to reduce ischaemia-reperfusion injury in elective liver resection with vascular occlusion. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(1):4-14.
98. Gui B, Hua F, Chen J, Xu Z, Sun H, Qian Y. Protective effects of pretreatment with oleanolic acid in rats in the acute phase of hepatic ischemia-reperfusion injury: role of the PI3K/Akt pathway. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1-7.
99. Akbari G, Mard SA, Dianat M, Mansouri E. The Hepatoprotective and MicroRNAs Downregulatory Effects of Crocin Following Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:11.
100. Mard SA, Akbari G, Dianat M, Mansouri E. Protective effects of crocin and zinc sulfate on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a comparative experimental model study. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;96:48-55.
101. Taha MO, Caricati-Neto A, Ferreira RM, Simões MdJ, Monteiro HP, Fagundes DJ. L-arginine in the ischemic phase protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2012;27:616-23.
102. Kong R, Gao Y, Sun B, Chen H, Wang G, Wang X, et al. The strategy of combined ischemia preconditioning and salvianolic acid-B pretreatment to prevent hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(12):2568-76.

103. Zhang J, Hu W, Xing W, You T, Xu J, Qin X, et al. The protective role of CD59 and pathogenic role of complement in hepatic ischemia and reperfusion injury. *The American journal of pathology*. 2011;179(6):2876-84.
104. Abdelsameea AA, Abbas NA, Abdel Raouf SM. Liraglutide attenuates partial warm ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2017;390(3):311-9.
105. Zhang M, Yang D, Gong X, Ge P, Dai J, Lin L, et al. Protective benefits of AMP-activated protein kinase in hepatic ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Translational Research*. 2017;9(3):823-9.
106. Teoh N, Ajamieh H, Wong H, Croft K, Mori T, Allison A, et al. Microparticles Mediate Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Are the Targets of Diannexin (ASP8597). *PloS one*. 2014;9(9):1-13.
107. Pantazi E, Bejaoui M, Zaouali MA, Folch-Puy E, Pinto Rolo A, Panisello A, et al. Losartan activates sirtuin 1 in rat reduced-size orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2015;21(26):8021-31.
108. Kim HJ, Joe Y, Kong JS, Jeong SO, Cho GJ, Ryter SW, et al. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1-11.
109. Kim HJ, Joe Y, Yu JK, Chen Y, Jeong SO, Mani N, et al. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by modulating the miR-34a/SIRT1 pathway. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(7):1550-9.
110. Jiang Q, Pan Y, Cheng Y, Li H, Li H. Protection of rat liver against hepatic ischemia-reperfusion injury by a novel selenocysteine-containing 7-mer peptide. *Molecular medicine reports*. 2016;14(3):2007-15.
111. Manne N, Arvapalli R, Graffeo VA, Bandarupalli VVK, Shokuhfar T, Patel S, et al. Prophylactic Treatment with Cerium Oxide Nanoparticles Attenuate Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in Sprague Dawley Rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017;42(5):1837-46.
112. Cho HI, Kim KM, Kwak JH, Lee SK, Lee SM. Protective mechanism of anethole on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of natural products*. 2013;76(9):1717-23.
113. Perez JC, Ramirez AC, Gonzalez LT, Espinosa LE, Quintana MM, Galvan GA, et al. Spironolactone Effect in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-9.
114. Zhang T, Ma Y, Xu KQ, Huang WQ. Pretreatment of parecoxib attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *BMC anesthesiology*. 2015;15:1-8.
115. Pan LJ, Zhang ZC, Zhang ZY, Wang WJ, Xu Y, Zhang ZM. Effects and mechanisms of store-operated calcium channel blockade on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2012;18(4):356-67.
116. Covington SM, Bauler LD, Toledo-Pereyra LH. Akt: A Therapeutic Target in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2017;30(1):47-55.
117. Xu F, Liu X, Wang C, Dai C. Prostaglandin E1 Preconditioning Attenuates Liver Ischemia Reperfusion Injury in a Rat Model of Extrahepatic Cholestasis. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1-11.

118. Tiriveedhi V, Upadhya GA, Busch RA, Gunter KL, Dines JN, Knolhoff BL, et al. Protective role of bortezomib in steatotic liver ischemia/reperfusion injury through abrogation of MMP activation and YKL-40 expression. *Transplant immunology*. 2014;30(2-3):93-8.
119. Xu D, Chen L, Chen X, Wen Y, Yu C, Yao J, et al. The triterpenoid CDDO-imidazolide ameliorates mouse liver ischemia-reperfusion injury through activating the Nrf2/HO-1 pathway enhanced autophagy. *Cell Death & Disease*. 2017;8:1-14.
120. Masuda Y, Vaziri ND, Takasu C, Li S, Robles L, Pham C, et al. Salutary effect of pre-treatment with an Nrf2 inducer on ischemia reperfusion injury in the rat liver. *Gastroenterology and hepatology*. 2014;1(1):1-7.
121. Gendy AM, Abdallah DM, El-Abhar HS. The potential curative effect of rebamipide in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2017;390(7):691-700.
122. Bahde R, Palmes D, Minin E, Stratmann U, Diller R, Haier J, et al. Bromelain ameliorates hepatic microcirculation after warm ischemia. *The Journal of surgical research*. 2007;139(1):88-96.
123. Gdara NB, Belgacem A, Khemiri I, Mannai S, Bitri L. Protective effects of phycocyanin on ischemia/reperfusion liver injuries. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;102:196-202.
124. de Oliveira THC, Marques PE, Poosti F, Ruytinx P, Amaral FA, Brandolini L, et al. Intravital Microscopic Evaluation of the Effects of a CXCR2 Antagonist in a Model of Liver Ischemia Reperfusion Injury in Mice. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1-13.
125. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horvath B, Batkai S, Park O, Tanchian G, et al. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. *Free radical biology & medicine*. 2011;50(10):1368-81.
126. Tao X, Sun X, Xu L, Yin L, Han X, Qi Y. Total Flavonoids from *Rosa laevigata* Michx Fruit Ameliorates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Nutrients*. 2016;8(7):1-14.
127. Tsaroucha AK, Valsami G, Kostomitsopoulos N, Lambropoulou M, Anagnostopoulos C, Christodoulou E, et al. Silibinin Effect on Fas/FasL, HMGB1, and CD45 Expressions in a Rat Model Subjected to Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2017:1-12.
128. Oltean M. Silybin Against Liver Ischemia-Reperfusion Injury: Something Old, Something New. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2017:1-2.
129. Bao Z, Chen W, Pan F, Peng B, Gong J. Role of mitofusin 2 in the protective effect of breviscapine against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(4):3582-8.
130. Uylas MU, Sahin A, Sahinturk V, Alatas IO. Quercetin dose affects the fate of hepatic ischemia and reperfusion injury in rats: An experimental research. *International journal of surgery (London, England)*. 2018;53:117-21.
131. Wu L, Zhang Q, Dai W, Li S, Feng J, Li J, et al. Quercetin Pretreatment Attenuates Hepatic Ischemia Reperfusion-Induced Apoptosis and Autophagy by Inhibiting ERK/NF-kappaB Pathway. *Gastroenterology research and practice*. 2017;2017:1-15.
132. Markmann JF. Relaxing Liver Ischemia Reperfusion Injury Down 1 Notch. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018:1-5.

133. Kageyama S, Nakamura K, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Serelaxin induces Notch1 signaling and alleviates hepatocellular damage in orthotopic liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018.
134. Fujii T, Obara H, Matsubara K, Fujimura N, Yagi H, Hibi T, et al. Oral administration of cilostazol improves survival rate after rat liver ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 2017;213:207-14.
135. Takasu C, Vaziri ND, Li S, Robles L, Vo K, Takasu M, et al. Treatment with dimethyl fumarate ameliorates liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2017;23(25):4508-16.
136. Hide D, Ortega-Ribera M, Garcia-Pagan JC, Peralta C, Bosch J, Gracia-Sancho J. Effects of warm ischemia and reperfusion on the liver microcirculatory phenotype of rats: underlying mechanisms and pharmacological therapy. *Scientific reports*. 2016;6:1-12.
137. Savvanis S, Nastos C, Tasoulis MK, Papoutsidakis N, Demonakou M, Karmaniolou I, et al. Sildenafil attenuates hepatocellular injury after liver ischemia reperfusion in rats: a preliminary study. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:1-10.
138. Rong YP, Huang HT, Liu JS, Wei L. Protective Effects of Geniposide on Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation proceedings*. 2017;49(6):1455-60.
139. Huang X, Gao Y, Qin J, Lu S. The role of miR-34a in the hepatoprotective effect of hydrogen sulfide on ischemia/reperfusion injury in young and old rats. *PloS one*. 2014;9(11):1-10.
140. Şahin T, Begeç Z, Toprak Hİ, Polat A, Vardi N, Yücel A, et al. The effects of dexmedetomidine on liver ischemia–reperfusion injury in rats. *Journal of Surgical Research*. 2013;183(1):385-90.
141. Tufek A, Tokgoz O, Aliosmanoglu I, Alabalik U, Evliyaoglu O, Ciftci T, et al. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *International journal of surgery (London, England)*. 2013;11(1):96-100.
142. Petrat F, Boengler K, Schulz R, de Groot H. Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge. *British journal of pharmacology*. 2012;165(7):2059-72.
143. Guan LY, Fu PY, Li PD, Li ZN, Liu HY, Xin MG, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World journal of gastrointestinal surgery*. 2014;6(7):122-8.
144. Bjornsson B, Bojmar L, Olsson H, Sundqvist T, Sandstrom P. Nitrite, a novel method to decrease ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *World J Gastroenterol*. 2015;21(6):1775-83.
145. Li Y, Li T, Qi H, Yuan F. Minocycline protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Biomedical reports*. 2015;3(1):19-24.
146. Richardson AJ, Laurence JM, Lam VWT. Use of pre-operative steroids in liver resection: a systematic review and meta-analysis. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2014;16(1):12-9.
147. Schmidt SC, Hamann S, Langrehr JM, Höflich C, Mittler J, Jacob D, et al. Preoperative high-dose steroid administration attenuates the surgical stress response following liver resection: results of a prospective randomized study. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2007;14(5):484-92.
148. Li H, Wei Y, Li B. Preoperative steroid administration in liver resection: a systematic review and meta-analysis. *Hepato-gastroenterology*. 2013;60(121):160-9.

149. Orci LA, Toso C, Mentha G, Morel P, Majno PE. Systematic review and meta-analysis of the effect of perioperative steroids on ischaemia-reperfusion injury and surgical stress response in patients undergoing liver resection. *The British journal of surgery*. 2013;100(5):600-9.
150. Weng J, Li W, Jia X, An W. Alleviation of Ischemia-Reperfusion Injury in Liver Steatosis by Augmenter of Liver Regeneration Is Attributed to Antioxidation and Preservation of Mitochondria. *Transplantation*. 2017;101(10):2340-8.
151. He SQ, Zhang YH, Venugopal SK, Dicus CW, Perez RV, Ramsamooj R, et al. Delivery of antioxidative enzyme genes protects against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(12):1869-79.
152. Ge M, Chen C, Yao W, Zhou S, Huang F, Cai J, et al. Overexpression of Brg1 Alleviates Hepatic Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury through Antioxidative Stress Effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-19.
153. Mahmoud MF, Gamal S, Shaheen MA, El-Fayoumi HM. The effects of tramadol on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Indian journal of pharmacology*. 2016;48(3):275-80.
154. Matsui N, Yoshioka R, Nozawa A, Kobayashi N, Shichijo Y, Yoshikawa T, et al. Caspase-Independent Apoptosis Induced by Reperfusion Following Ischemia without Bile Duct Occlusion in Rat Liver. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2017;40(1):104-7.
155. Khodosovsky MN. Effects of Hypoxic Preconditioning on the Mechanisms of Oxygen Transport and Oxidative Damage during Hepatic Ischemia-Reperfusion Syndrome in Rabbits. *Int J Phys Pathophys*. 2017;8(2):165-75.
156. Chu MJ, Vather R, Hickey AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Impact of ischaemic preconditioning on experimental steatotic livers following hepatic ischaemia-reperfusion injury: a systematic review. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2015;17(1):1-10.
157. 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 & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2014;13(1):40-7.
158. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124.
159. Maroko PR, Libby P, Covell JW, Sobel BE, Ross J, Jr., Braunwald E. Precordial S-T segment elevation mapping: an atraumatic method for assessing alterations in the extent of myocardial ischemic injury. The effects of pharmacologic and hemodynamic interventions. *The American journal of cardiology*. 1972;29(2):223-30.
160. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Botker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic research in cardiology*. 2016;111(6):1-24.
161. Suyavaran A, Thirunavukkarasu C. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion-induced injury: Update on molecular and future perspectives. *Hepatology Research*. 2017;47(1):31-48.
162. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman M, Prats N, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology*. 2001;34(6):1164-73.

163. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective Effects of Ischemic Preconditioning for Liver Resection Performed Under Inflow Occlusion in Humans. *Ann Surg.* 2000;232(2):155-62.
164. Song X, Zhang N, Xu H, Cao L, Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *International journal of biological sciences.* 2012;8(5):707-18.
165. Bystrom P, Foley N, Toledo-Pereyra L, Quesnelle K. Ischemic preconditioning modulates ROS to confer protection in liver ischemia and reperfusion. *EXCLI Journal.* 2017;16:483-96.
166. Theodoraki K, Karmanioliou I, Tympa A, Tasoulis MK, Nastos C, Vassiliou I, et al. Beyond Preconditioning: Postconditioning as an Alternative Technique in the Prevention of Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1-21.
167. Feyzizadeh S, Badalzadeh R. Application of ischemic postconditioning's algorithms in tissues protection: response to methodological gaps in preclinical and clinical studies. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2017;21(10):2257-67.
168. Teixeira AR, Molan NT, Kubrusly MS, Bellodi-Privato M, Coelho AM, Leite KR, et al. Postconditioning ameliorates lipid peroxidation in liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2009;24(1):52-6.
169. Li JH, Jia JJ, Shen W, Chen SS, Jiang L, Xie HY, et al. Optimized postconditioning algorithm protects liver graft after liver transplantation in rats. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT.* 2018;17(1):32-8.
170. Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic preconditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2009(1):1-31.
171. O'Neill S, Leuschner S, McNally SJ, Garden OJ, Wigmore SJ, Harrison EM. Meta-analysis of ischaemic preconditioning for liver resections. *The British journal of surgery.* 2013;100(13):1689-700.
172. Selzner N, Boehnert M, Selzner M. Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transplantation reviews (Orlando, Fla).* 2012;26(2):115-24.
173. Tapuria N, Junnarkar S, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR. Haemoxygenase modulates cytokine induced neutrophil chemoattractant in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2016;22(33):7518-35.
174. Uysal AI, Ocmen E, Akan M, Ozkardesler S, Ergur BU, Guneli E, et al. The effects of remote ischemic preconditioning and N-acetylcysteine with remote ischemic preconditioning in rat hepatic ischemia reperfusion injury model. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-6.
175. Tapuria N, Junnarkar S, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR. Modulation of microcirculatory changes in the late phase of hepatic ischaemia-reperfusion injury by remote ischaemic preconditioning. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association.* 2012;14(2):87-97.
176. Noorbakhsh M-F, Arab H-A, Kazerani H-R. Liver ischemia preconditions the heart against ischemia-reperfusion arrhythmias. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 2015;18(1):80-8.
177. Xue TM, Tao LD, Zhang J, Zhang PJ, Liu X, Chen GF, et al. Intestinal ischemic preconditioning reduces liver ischemia reperfusion injury in rats. *Molecular medicine reports.* 2016;13(3):2511-7.

178. Tasoulis MK, Douzinas EE. Hypoxemic reperfusion of ischemic states: an alternative approach for the attenuation of oxidative stress mediated reperfusion injury. *Journal of biomedical science*. 2016;23:1-8.
179. Duan YF, An Y, Zhu F, Jiang Y. Remote ischemic preconditioning protects liver ischemia-reperfusion injury by regulating eNOS-NO pathway and liver microRNA expressions in fatty liver rats. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2017;16(4):387-94.
180. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol*. 2013;19(11):1683-98.
181. Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Peralta C. Ischemic Preconditioning Increases the Tolerance of Fatty Liver to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. *The American journal of pathology*. 2002;161(2):587-601.
182. Jin LM, Liu YX, Zhou L, Xie HY, Feng XW, Li H, et al. Ischemic preconditioning attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2010;77(3):136-46.
183. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;284(1):15-26.
184. Adam AN. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *International journal of general medicine*. 2014;7:483-9.
185. Bjornsson B, Winbladh A, Bojmar L, Sundqvist T, Gullstrand P, Sandstrom P. Conventional, but not remote ischemic preconditioning, reduces iNOS transcription in liver ischemia/reperfusion. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9506-12.
186. Boyko VV, Pisetska ME, Tyshchenko OM, Skoryi DI, Kozlova TV, Gorgol NI, et al. Role of ischemic preconditioning in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2014;3(4):179-84.
187. Gurusamy KS, Sheth H, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(1):1-47.
188. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg*. 2006;244(6):921-8; discussion 8-30.
189. Wang PF, Li CH, Chen YW, Zhang AQ, Cai SW, Dong JH. Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion improves remnant liver regeneration in rats after partial hepatectomy. *The Journal of surgical research*. 2013;181(2):329-36.
190. Shi B, Li CH, Chen YW, Yang SZ, Zhang AQ, Dong JH. Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces the outgrowth of hepatocarcinoma in mice after ischemia-reperfusion. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2014;44(12):1224-33.
191. Li CH, Chen YW, Chen YL, Yao LB, Ge XL, Pan K, et al. Preserving low perfusion during surgical liver blood inflow control prevents hepatic microcirculatory dysfunction and irreversible hepatocyte injury in rats. *Scientific reports*. 2015;5:1-12.
192. Chen YW, Li CH, Zhang AQ, Yang SZ, Zhang WZ, Dong JH. Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats. *The Journal of surgical research*. 2012;174(1):150-6.

193. Jia C, Dai C, Wang H, Wan Y, Qiao Y, Xu F, et al. Differential Effects of Three Techniques for Hepatic Vascular Exclusion during Resection for Liver Cirrhosis on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Gastroenterology research and practice*. 2018;2018:1-10.
194. Hsieh C-C, Hsieh S-C, Chiu J-H, Wu Y-L. Preconditioning somatothermal stimulation on Qimen (LR14) reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;14:1-10.
195. Golshahi H, Tavasoly A, Mardjanmehr SH, Abdi KM, Dehghan MM, Mohajeri SF. Protective effect of intraportal infusion of hypothermic hydrogen-rich saline solution on hepatic warm ischemia/reperfusion injury in rat model. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2017;10-21.
196. Nanchal R, Kumar G. Hypothermia in Acute Liver Failure. In: Sadaka F, editor. *Therapeutic Hypothermia in Brain Injury*. Rijeka: InTech; 2013. p. 99-110.
197. Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, et al. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free radical biology & medicine*. 2003;35(8):901-9.
198. Yamanaka N, Dai C-L, Okamoto E. Historical Evolution of Hypothermic Liver Surgery. *World journal of surgery*. 1998;22(10):1104-7.
199. Bigelow WG, Lindsay WK, Greenwood WF. Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg*. 1950;132(5):849-66.
200. Lewis FJ, Taufic M. Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery*. 1953;33(1):52-9.
201. Raffucci FL. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. *Surgery*. 1953;33(3):342-51.
202. Graydon R, Goodall W, Hyndman WW, Gurd FN. Studies on hypothermia in abdominal surgery. II. Occlusion of the vascular inflow to the liver. *AMA archives of surgery*. 1957;75(6):1011-9.
203. Longmire WP, Marable SA. Clinical Experiences with Major Hepatic Resections. *Ann Surg*. 1961;154(3):460-72.
204. Reiniers MJ. Visualizing and targeting oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury. PhD Thesis. UvA-DARE (Digital Academic Repository): University of Amsterdam; 2017.
205. Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, van Gulik TM. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs. *Surgery*. 2003;134(5):806-17.
206. Heijnen BH, Straatsburg IH, Kager LM, van der Kleij AJ, Gouma DJ, van Gulik TM. Effect of in situ hypothermic perfusion on intrahepatic pO₂ and reactive oxygen species formation after partial hepatectomy under total hepatic vascular exclusion in pigs. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2003;23(1):19-27.
207. Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2003;10(3):195-9.
208. Abdo EE, Figueira ERR, Rocha-Filho JA, Chaib E, D'Albuquerque LAC, Bacchella T. Preliminary results of topical hepatic hypothermia in a model of liver ischemia/ reperfusion injury in rats. *Arquivos de gastroenterologia*. 2017;54(3):246-9.

209. Imakita M, Yamanaka N, Kuroda N, Kitayama Y, Okamoto E. Does topical cooling alleviate ischemia/reperfusion injury during inflow occlusion in hepatectomy? Results of an experimental and clinical study. *Surgery today*. 2000;30(9):795-804.
210. Yamanaka N, Yamanaka J, Tanaka T, Tanaka W, Yasui C, Ando T, et al. Topical cooling assisted hepatic resection of segment 7 and 8 oriented by en-bloc interruption of the targeted portal pedicles. *Hepato-gastroenterology*. 1999;46(25):417-24.
211. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *Journal of the American College of Surgeons*. 2000;191(6):650-6.
212. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(6):734-41.
213. Dinant S, van Veen SQ, Roseboom HJ, van Vliet AK, van Gulik TM. Liver protection by hypothermic perfusion at different temperatures during total vascular exclusion. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(4):486-93.
214. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001;72(9):1486-90.
215. Heijnen BH, van Veen SQ, Straatsburg IH, van Gulik TM. Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2001;91(1):265-8.
216. Quireze Jr C, Speranzini MB, Montero EFS, Juliano Y, Novo NF, Nigro AJT. Efeito da hipotermia hepática na isquemia e reperfusão em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2000;15:32.
217. Choi S, Noh J, Hirose R, Ferrell L, Bedolli M, Roberts JP, et al. Mild hypothermia provides significant protection against ischemia/reperfusion injury in livers of obese and lean rats. *Ann Surg*. 2005;241(3):470-6.
218. Alva N, Carbonell T, Palomeque J. Deep hypothermia impact on acid-base parameters and liver antioxidant status in an in vivo rat model. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009;87(6):471-8.
219. Alva N, Azuara D, Palomeque J, Carbonell T. Deep hypothermia protects against acute hypoxia in vivo in rats: a mechanism related to the attenuation of oxidative stress. *Experimental physiology*. 2013;98(6):1115-24.
220. Lampe JW, Becker LB. State of the art in therapeutic hypothermia. *Annual review of medicine*. 2011;62:79-93.
221. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;282(4):608-16.
222. Niemann CU, Xu F, Choi S, Behrends M, Park Y, Hirose R, et al. Short passive cooling protects rats during hepatectomy by inducing heat shock proteins and limiting the induction of pro-inflammatory cytokines. *The Journal of surgical research*. 2010;158(1):43-52.
223. Kuboki S, Okaya T, Schuster R, Blanchard J, Denenberg A, Wong HR, et al. Hepatocyte NF-kappaB activation is hepatoprotective during ischemia-reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2007;292(1):201-7.

224. Alva N, Palomeque J, Carbonell T. Oxidative Stress and Antioxidant Activity in Hypothermia and Rewarming: Can RONS Modulate the Beneficial Effects of Therapeutic Hypothermia? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1-10.
225. Niemann CU, Choi S, Behrends M, Hirose R, Noh J, Coatney JL, et al. Mild hypothermia protects obese rats from fulminant hepatic necrosis induced by ischemia-reperfusion. *Surgery*. 2006;140(3):404-12.
226. Takeuchi K, Ohira M, Yamashita T, Sowa M. An experimental study of hepatic resection using an in situ hypothermic perfusion technique. 1997;44:1281-94.
227. Azoulay D, Eshkenazy R, Andreani P, Castaing D, Adam R, Ichai P, et al. In situ hypothermic perfusion of the liver versus standard total vascular exclusion for complex liver resection. *Ann Surg*. 2005;241(2):277-85.
228. Hoti E, Salloum C, Azoulay D. Hepatic resection with in situ hypothermic perfusion is superior to other resection techniques. *Digestive surgery*. 2011;28(2):94-9.
229. Wang CY, Ni Y, Liu Y, Huang ZH, Zhang MJ, Zhan YQ, et al. Mild hypothermia protects liver against ischemia and reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2005;11(19):3005-7.
230. Xiao Q, Ye Q, Wang W, Xiao J, Fu B, Xia Z, et al. Mild hypothermia pretreatment protects against liver ischemia reperfusion injury via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway. *Molecular medicine reports*. 2017;16(5):7520-6.
231. Wang W, Xiao Q, Hu XY, Liu ZZ, Zhang XJ, Xia ZP, et al. Mild Hypothermia Pretreatment Attenuates Liver Ischemia Reperfusion Injury Through Inhibiting c-Jun NH2-terminal Kinase Phosphorylation in Rats. *Transplantation proceedings*. 2018;50(1):259-66.
232. Alva N, Bardallo RG, Basanta D, Palomeque J, Carbonell T. Preconditioning-Like Properties of Short-Term Hypothermia in Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) System. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4):1-13.
233. Olthof PB, Reiniers MJ, Dirkes MC, Van Gulik TM, Heger M, Van Golen RF. Protective mechanisms of hypothermia in liver surgery and transplantation. *Molecular medicine*. 2015;21:833-46.
234. Schlegel A, Kron P, Dutkowski P. Hypothermic Oxygenated Liver Perfusion: Basic Mechanisms and Clinical Application. *Curr Transplant Rep*. 2015;2(1):52-62.
235. Berardo C, Di Pasqua LG, Siciliano V, Rizzo V, Richelmi P, Ferrigno A, et al. Machine Perfusion at 20 degrees C Prevents Ischemic Injury and Reduces Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression During Rat Liver Preservation. *Annals of transplantation*. 2017;22:581-9.
236. Ceresa CDL, Nasralla D, Jassem W. Normothermic Machine Preservation of the Liver: State of the Art. *Curr Transplant Rep*. 2018;5(1):104-10.
237. Michel S, Madsen J. Current perspectives in transplant medicine: Hypothermic oxygenated perfusion. *Transplant Research and Risk Management*. 2016;8:25-30.
238. Freitas I, Bertone V, Guarnaschelli C, Ferrigno A, Boncompagni E, Rizzo V, et al. In situ demonstration of improvement of liver mitochondria function by melatonin after cold ischemia. *In vivo*. 2006;20(2):229-37.
239. Mortezaee K, Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(5):4015-32.
240. Uto K, Que W, Sakamoto S, Zhong L, Li X-K, Inomata Y. Hydrogen Rich Solution Attenuates Cold Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Liver Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(5):1-2.

241. Dozen M, Enosawa S, Tada Y, Hirasawa K. Inhibition of Hepatic Ischemic Reperfusion Injury Using Saline Exposed to Electron Discharge in a Rat Model. *Cell Medicine*. 2013;5(2-3):83-7.
242. Longo L, Sinigaglia-Fratta LX, Weber GR, Janz-Moreira A, Kretzmann NA, Grezzana-Filho Tde J, et al. Hypothermia is better than ischemic preconditioning for preventing early hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Annals of hepatology*. 2016;15(1):110-20.
243. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Kruel CD, Corso CO. Topical liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(4):262-6.
244. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, et al. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26(3):194-201.
245. Grezzana Filho Tde J. Hipotermia hepática tópica associada ao pré-condicionamento isquêmico: análise dos danos hepatocelulares, função hepática e estresse oxidativo em um modelo de isquemia e reperfusão em ratos. Porto Alegre - Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
246. Kanoria S, Glantzounis G, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, et al. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation proceedings*. 2004;36(9):2586-9.
247. Gomes HM, Serigiolle LC, Rodrigues DA, Lopes CM, Studart Sdo V, Leme PL. Unfeasible experimental model of normothermic hepatic ischemia and reperfusion in rats using the Pringle maneuver. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*. 2014;27(3):196-200.
248. Seabra AL, Savassi-Rocha PR, Vasconcelos AC, Lima AS, Rodrigues KC, Almeida HM. Ischemia/reperfusion injury after continuous or intermittent hepatic pedicle clamping in rabbits. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*. 2012;25(2):105-9.
249. Pinto Kruel CR, Scherer de Fraga R, Dal Molin S, Mota SM, Gasperin G, Cerski CT, et al. Hepatic reperfusion in rats: a new model with portal arterialization in studying early ischemia-reperfusion injury. *Transplantation proceedings*. 2007;39(10):3015-8.
250. Abe Y, Hines IN, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(1):1-7.
251. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *The Journal of surgical research*. 2014;191(2):399-412.
252. Steenks M, van Baal MC, Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Teo MH, et al. Intermittent ischaemia maintains function after ischaemia reperfusion in steatotic livers. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(4):250-61.
253. McCafferty K, Forbes S, Thiernemann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Disease models & mechanisms*. 2014;7(12):1321-33.
254. van Golen RF, Reiniers MJ, Heger M, Verheij J. Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models. *J Hepatol*. 2015;62(4):975-7.

255. Li W, Ding Y. Cardiac preconditioning and cardiovascular diseases. *Heart and Mind*. 2017;1(1):17-21.
256. Barros MMLd. Microcirculation Response to Ischemia-Reperfusion Injury. UC San Diego Electronic Theses and Dissertations: UC San Diego; 2014.
257. Nadarajah L, Yaqoob MM, McCafferty K. Ischemic conditioning in solid organ transplantation: is it worth giving your right arm for? *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2017;26(6):467-76.
258. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI Journal*. 2016;15:817-28.
259. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-72.
260. Brosnan ME, Brosnan JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;90(3):857-61.
261. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *The Anatomical record*. 1954;119(1):11-33.
262. Comar JF, Suzuki-Kemmelmeier F, Constantin J, Bracht A. Hepatic zonation of carbon and nitrogen fluxes derived from glutamine and ammonia transformations. *Journal of biomedical science*. 2010;17(1):1-11.
263. Gebhardt R, Hovhannisyan A. Organ patterning in the adult stage: the role of Wnt/beta-catenin signaling in liver zonation and beyond. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2010;239(1):45-55.
264. Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, et al. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biology of the cell*. 2005;97(4):277-88.
265. Burke ZD, Reed KR, Pheesse TJ, Sansom OJ, Clarke AR, Tosh D. Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2316-24.
266. Colnot S, Perret C. Liver Zonation. In: Monga SPS, editor. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Boston, MA: Springer US; 2011. p. 7-16.

Artigo em Português

HIPOTERMIA HEPÁTICA TÓPICA ASSOCIADA AO PRÉ- CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS DANOS DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM MODELO COM 24 HORAS DE EVOLUÇÃO

Autores: Gémerson Gabiatti¹, Tomaz Grezzana², Carlos Thadeu Schmidt Cerski³, Carlos Bofill⁴, Stella Valle⁵, Carlos Otávio Corso⁶

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Unidade de Experimentação Animal (UEA) – Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 90035-903

¹ Cirurgião Geral, Mestre em Cirurgia, Aluno do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da UFRGS

² Cirurgião Geral do HCPA, Doutor em Cirurgia, Membro da Equipe de Transplantes do HCPA

³ Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da UFRGS, Patologista do HCPA

⁴ Acadêmico do Curso de Medicina da UFRGS

⁵ Coordenadora do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – LACVet, Vice-diretora da Faculdade de Veterinária da UFRGS

⁶ MD, MSc, PhD, TCBC, FACS, Professor Associado, Departamento de Cirurgia Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço do autor: Rua Botafogo 1246, Apto 1002
90150-052 – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

e-mail: gabiatti@yahoo.com

Contribuição dos Autores:

Todos os autores participaram ativamente de todas as etapas deste projeto de pesquisa.

Lista de abreviaturas: **ALT:** Alanina aminotransferase; **AMO:** Amônia; **AST:** Aspartato aminotransferase; **BD:** Bilirrubina direta; **BT:** Bilirrubina total; **C:** Controle; **CHSM:** Classificação histopatológica de Suzuki modificada; **CS:** Congestão sinusoidal; **DH:** Degeneração hidrópica; **E:** Esteatose; **ERN:** Espécies reativas de nitrogênio; **ERO:** Espécies reativas de oxigênio; **ESM:** Escore de Suzuki modificado; **FA:** Fosfatase alcalina; **FC:** Frequência cardíaca; **FI:** Fígado isquêmico; **FNI:** Fígado não isquêmico; **FR:** Frequência respiratória; **GGT:** Gama glutamil transpeptidase; **GLI:** Glicose; **HE:** Hematoxilina + eosina; **HT:** Hipotermia tópica; **IL:** Interleucina; **ILN:** Infiltrado leucocitário neutrofílico; **IN:** Isquemia normotérmica; **IRH:** Isquemia e reperfusão hepática; **LAC:** Lactato; **LDH:** Lactato desidrogenase; **NZ:** Necrose de zona hepática; **PAM:** Pressão arterial média; **PCI:** Pré-condicionamento isquêmico; **TIH:** Temperatura intra-hepática; **TNF-alfa:** Fator de necrose tumoral alfa; **TS:** Temperatura sistêmica.

Resumo

Introdução: O processo de isquemia e reperfusão hepática (IRH) é conhecido por sua complexidade de causas e efeitos, estando associado a vários cenários assistenciais, como cirurgia hepática, trauma e transplantes, sendo ainda restritas as abordagens que se destinam a controlar este processo, destacando-se o pré-condicionamento isquêmico (PCI) e a hipotermia tópica (HT) quando comparados à isquemia normotérmica (IN).

Objetivos: Este estudo visa analisar os resultados bioquímicos e histopatológicos tardios (24 horas) da aplicação isolada e combinada destes mecanismos hepatoprotetores citados.

Método: Foi utilizado um modelo animal modificado de dano hepático grave produzido através de 90 minutos de isquemia segmentar (70% do órgão) e observação por 24 horas de pós reperfusão, aplicando-se, no intraoperatório, de forma isolada e combinada, PCI e HT a 26 °C, coletando parâmetros biométricos transoperatórios somados a análise tardia de marcadores bioquímicos e histopatológicos, ambos com 24 horas de evolução. Os animais foram divididos em cinco grupos: controle (C), isquemia normotérmica (IN), pré-condicionamento isquêmico (PCI), hipotermia tópica (HT) e pré-condicionamento isquêmico associado com hipotermia tópica (PCI+HT). O nível de significância considerado significativo foi $p < 0,05$ e os testes estatísticos utilizados foram: análise de variância para medidas repetidas através de modelo misto, modelo linear generalizado com distribuição gama para avaliar efeito de grupos e teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

Resultados: Todos os grupos deste modelo se comportaram, sob ponto de vista dos parâmetros fisiológicos, de forma homogênea durante o transoperatório ($p > 0,05$). Animais submetidos a IN e PCI obtiveram piores escores bioquímicos (Gama Glutamil Transpeptidase, Fosfatase Alcalina, Lactato Desidrogenase, Aspartato Aminotransferase, Alanina Aminotransferase, Bilirrubina

Direta e Bilirrubina Total) e histopatológicos (Escore de Suzuki Modificado) se comparados aos grupos controle e grupos com HT isolada ou associada ($p < 0,05$). Itens individuais do escore como infiltrado leucocitário neutrofílico e necrose de zonas histológicas 2 e 3 também foram achados significativos para o grupo IN ($p < 0,05$).

Conclusão: Neste cenário extremo de IRH deste modelo específico, somente os grupos submetidos à HT, combinada ao PCI ou isolada, têm melhor desfecho quando comparados aos demais grupos submetidos somente a PCI e a isquemia normotérmica (IN), obtendo escores bioquímicos e histopatológicos semelhantes ao grupo controle.

Palavras-Chave: Isquemia e Reperfusão Hepática, Pré-Condicionamento Isquêmico, Hipotermia Tópica.

Introdução

O fenômeno de isquemia e reperfusão hepática (IRH) tem sido objeto de intenso estudo nas últimas décadas. Faz parte de inúmeros cenários assistenciais, incluindo trauma, choque hemorrágico e ressuscitação, choque séptico, insuficiência cardíaca, insuficiência respiratória, hepatectomias e transplante hepático ⁽¹⁾. Com a introdução das técnicas de controle cirúrgico do pedículo vascular hepático, hoje ainda eventualmente necessário durante procedimentos cirúrgicos sobre o órgão ⁽²⁾, a isquemia e a reperfusão têm sido consideradas elementos-chave nos resultados de morbimortalidade pós-operatória, uma vez que complicações graves, como a disfunção e/ou a insuficiência hepática podem resultar deste processo de reperfusão, podendo ainda atingir outros órgãos e sistemas ⁽³⁾, sendo os principais mecanismos envolvidos a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) ⁽⁴⁾ somados à infiltração de polimorfonucleares, entre outros mecanismos de lesão celular ⁽⁵⁾. Em situações de normotermia, o fígado consegue tolerar o clampeamento dos vasos do seu pedículo por aproximadamente 1 hora quando o parênquima hepático é normal e proteção adicional se faz necessária quando se trata de fígados doentes ⁽⁶⁾.

Para minimizar os efeitos da IRH, vários métodos têm sido estudados ⁽⁷⁻⁹⁾, incluindo entre estes, o PCI ^(10, 11) e a Hipotermia Tópica (HT) ⁽¹²⁾. A redução do estresse oxidativo relacionado com a aplicação do PCI é multifatorial ^(13, 14), com ativação de genes específicos, produção de enzimas antioxidantes e produção de óxido nítrico, sendo este último um potente vasodilatador com importante efeito antagonista durante a fase de isquemia do órgão ^(15, 16). A hipotermia atinge seus objetivos induzindo hipometabolismo, através da supressão da atividade mitocondrial como parte fundamental do seu efeito citoprotetor ^(17, 18).

A associação do PCI com a HT e a comparação isolada dos mesmos em um modelo de IRH com lesão extrema, monitorando parâmetros fisiológicos intraoperatórios ⁽¹⁹⁾ e comparando

suas possíveis consequências histopatológicas ⁽²⁰⁾ e bioquímicas ⁽²¹⁾ aferidas em 24 horas de reperfusão após o insulto isquêmico é a proposta deste projeto científico. A aplicação da HT, isolada ou em conjunto com PCI, já foi avaliada pelo nosso grupo de estudos em modelo animal agudo com isquemia hepática parcial de 90 minutos seguido de reperfusão de 120 minutos e eutanásia imediata, sendo demonstrados seus efeitos protetores através da redução dos níveis de marcadores inflamatórios como TNF-alfa, IL1, IL6 e IL12, aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL10, aumento dos níveis de óxido nítrico além de elevação dos níveis de expressão dos genes Nrf2, Keap1 e NQO1, todos relacionados a efeitos antioxidantes ⁽²²⁻²⁴⁾.

Modificações foram desenvolvidas a partir da técnica original daquele modelo de isquemia parcial, especialmente relacionadas ao método anestésico, incisão cirúrgica e cuidados trans e pós-operatórios, permitindo assim obter um modelo experimental com tempo de observação estendido de 24 horas de reperfusão, possibilitando analisar tardiamente os efeitos dos diferentes métodos de citoproteção (PCI e HT), comparando-os entre si. A aplicação combinada destas técnicas, PCI e HT, em um modelo com este tempo de duração, tanto de isquemia como de reperfusão, não foi descrita até o momento e se justifica plenamente considerando o platô terapêutico atingido no que refere à busca de opções comprovadamente efetivas em relação ao controle da IRH experimental, mas com grande chance de aplicabilidade clínica, sendo este possivelmente o ponto crítico dos estudos atuais relacionados à IRH: a aplicação e a reprodução dos estudos experimentais em modelos clínicos assistenciais ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Materiais e Métodos

Este estudo, identificado pelo número 08486, foi aprovado pelo Comitê de Bioética em Pesquisa vinculado ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA-UFRGS, o qual segue as normas do Conselho Internacional das Ciências Médicas (CIOMS). Foram utilizados 33 ratos

machos da raça Wistar, com peso médio de 279 gramas, divididos em 5 grupos, com média de idade de 65 dias.

2.1 – Grupos de Estudo

A amostra foi dividida em 05 grupos, sendo o grupo controle (C) com 05 animais e os demais com 07: Isquemia Normotérmica (IN), Hipotermia Tópica a 26 °C (HT), Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI) e Pré-Condicionamento Isquêmico + Hipotermia Tópica a 26 °C (PCI+HT).

2.2 – Protocolo Anestésico

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória, administrada através de cânula facial conectada a respirador, o qual mantinha fluxo de oxigênio constante a 0,5 litro por minuto e mistura anestésica com isoflurano variando entre 1 a 2%. A porção superior do abdome e a região cervical direita foram tricotomizados e preparados com iodoform aquoso.

A monitoração foi realizada através de um cateter instalado na artéria carótida direita (PE-50, Portex, Kent, Inglaterra) para controle da PAM durante todo o procedimento. Adicionalmente, foi realizada oximetria através de sensor externo aplicado na cauda do animal, permitindo também o registro da frequência cardíaca. Foram infundidos de forma contínua 2 ml/kg/h de solução fisiológica (NaCl 0,9%) pela artéria carótida para reposição das necessidades basais, compensação das perdas hidroeletrolíticas e para manter os cateteres pérvios. A temperatura corporal foi monitorizada através de termômetro retal digital e mantida constante entre 36 °C e 37.5 °C com o auxílio de um dispositivo de aquecimento da mesa cirúrgica e por aquecimento externo com lâmpada.

2.3 – Procedimento Cirúrgico

O acesso à cavidade abdominal foi realizado através de laparotomia mediana. No grupo controle (C), os lobos hepáticos foram isolados, sem nenhum procedimento adicional. Nos

grupos com isquemia (IN, PCI, HT e PCI+HT), o fígado foi isolado no campo operatório e um clipe atraumático neurocirúrgico foi utilizado para interromper o fluxo sanguíneo portal e arterial para os lobos esquerdo e mediano (70% da massa hepática) por 90 minutos, enquanto os lobos lateral direito e caudado permaneceram com seus fluxos de entrada e saída sem interrupção. Nos grupos com PCI, os lobos esquerdo e mediano do fígado foram isolados no campo operatório e submetidos a uma isquemia de 10 minutos, seguida de reperfusão por outros 10 minutos, antes do clampeamento final por 90 minutos.

Nos grupos com hipotermia, os lobos hepáticos foram isolados no campo operatório através de um dispositivo termo isolante de isopor côncavo, semelhante a uma concha, e resfriados através de solução fisiológica gelada, gotejada sobre a superfície dos lobos isquêmicos durante o período da isquemia de 90 minutos. O excesso de líquido foi retirado por aspiradores, evitando que o líquido gelado penetrasse na cavidade abdominal e provocasse hipotermia sistêmica no animal, semelhante ao modelo desenvolvido por Biberthaler e colaboradores ⁽²⁸⁾. Um microprobe flexível (IT-23 – Braintree Scientific) foi implantado no lobo esquerdo e a temperatura intra-hepática (TIH) monitorada continuamente para alcançar 26 °C localmente (Thermalert Monitoring Thermometer TH-5, Braintree Scientific). Nos demais grupos também foi registrada a TIH no mesmo ponto de inserção e com mesma duração de aferição.

Durante todo o procedimento, em intervalos de 15 minutos, foram registrados os parâmetros fisiológicos vitais como Frequência Cardíaca (FC), Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Respiratória (FR), Temperatura Sistêmica (TS) e Temperatura Intra-Hepática (TIH). Em todos os grupos também foram registrados os parâmetros citados 01 minuto após o desclampeamento do pedículo (91 minutos de procedimento). O percentual de isoflurano na mistura anestésica inalatória também foi registrado durante todos os procedimentos, além da temperatura da sala cirúrgica.

2.4 – Procedimentos Pós-Anestésicos e Coletas

Depois de transcorridos 90 minutos de isquemia, os cliques metálicos do pedículo foram removidos e o órgão reperfundido. O abdome foi fechado, a incisão cirúrgica infiltrada com solução de 0,1ml bupivacaína 0,5% em 0,9ml de Solução Fisiológica e o animal transferido para incubadora para recuperação anestésica.

Ao término de 24 horas, os ratos foram novamente anestesiados com Isoflurano por via inalatória de maneira idêntica aquela utilizada no procedimento prévio. O abdome foi aberto e os animais foram sacrificados por punção cardíaca e aspiração sanguínea exsanguinante. Órgãos como fígado, pulmão, coração, rins e intestino delgado foram removidos e armazenados: uma fração foi fixada em formalina e outra fração congelada em nitrogênio e mantidos em freezer a – 80 °C. O sangue foi imediatamente centrifugado e o plasma obtido congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a – 80 °C. As amostras de fígado foram identificadas a partir da área em que se originaram em cada experimento: isquêmicas (FI), quando pertencentes à zona com intervenção (lobo esquerdo e mediano) e não isquêmicas (FNI), quando pertencentes a segmento hepático que foi preservado tanto da isquemia por clampeamento pedicular como da aplicação da hipotermia (lobo direito).

2.5 – Análise Plasmática

A análise plasmática bioquímica do material armazenado foi realizada pelo laboratório certificado e especializado da faculdade de veterinária da UFRGS (LACVet-UFRGS) em equipamento WIENER–CM200 com reagentes importados específicos para o animal utilizado (WIENER e RANDOX). Foram dosados os níveis de Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Amônia (AMO), Bilirrubina Total (BT) e Bilirrubina Direta

(BD), Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transpeptidase (GGT), Glicose (GLI), Lactato (LAC) e Lactato Desidrogenase (LDH).

2.6 – Análise Histopatológica

As amostras do fígado, divididas em fígado isquêmico (FI) e não isquêmico (FNI) do mesmo animal, foram fixadas em formalina a 10% e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação cegada de cada espécime foi realizada pelo serviço de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) utilizando microscópio óptico e atribuindo-se um valor para as alterações morfológicas observadas, seguindo modelo original proposto por Suzuki e colaboradores ⁽²⁹⁾, avaliando achados de congestão sinusoidal (CS), degeneração hidrópica (DH), infiltrado leucocitário neutrofílico (ILN) e necrose hepatocelular. Foram acrescentados a estes parâmetros a graduação dos achados de esteatose (E) e também a análise da zona de necrose também foi aprimorada (Classificação Histopatológica de Suzuki Modificada, CHSM), sendo esta realizada de forma estratificada, utilizando o princípio de zoneamento hepático (figura 1) ⁽³⁰⁾ a partir do qual cada lóbulo é dividido em 03 zonas: Zona 1 (NZ1), partindo da área junto à tríade portal; Zona 2 (NZ2), passando por região intermediária sinusoidal e Zona 3 (NZ3), na região próxima a veia centro lobular, conforme tabela 1, sendo então o escore histológico final (Escore de Suzuki Modificado, ESM) calculado a partir da fórmula 1.

Todos os dados, apresentados sob forma de média e desvio padrão, foram analisados sob ponto de vista de significância estatística usando softwares Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17 e Statistical Analysis System (SAS) versão 9.4, admitindo-se nível de significância p de 0,05 para os testes empregados (análise de variância para medidas repetidas através de modelo misto, modelo linear generalizado com distribuição gama para avaliar efeito de grupos e teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes).

3- Resultados

3.1 – Resultados dos dados biométricos transoperatórios.

A análise dos sinais vitais transoperatórios (análise de variância para medidas repetidas através de modelo misto) demonstrou homogeneidade de comportamento dos parâmetros nos grupos. Aos 91 minutos, 01 minuto pós desclameamento do pedículo hepático, ocorreu queda uniforme na PAM em todos os grupos e também elevação rápida da TIH nos grupos submetidos à hipotermia. A análise da TS e também dos demais parâmetros não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os dados fisiológicos transoperatórios dos diferentes grupos analisados. O percentual de isoflurano na mistura anestésica manteve-se estável entre os grupos nos diferentes momentos aferidos, sem apresentar diferença entre os grupos. As variáveis peso, idade e temperatura da sala cirúrgica também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

3.2 – Resultados da análise bioquímica do plasma pós-isquemia de 90 minutos e reperfusão de 24 horas

A análise dos dados bioquímicos, realizada através do ajuste de modelo linear generalizado com distribuição gama para avaliar efeito de grupos (para dados assimétricos), permitiu observar diferenças significativas ($p < 0.05$) nas dosagens de GGT, FA, LDH, AST, ALT, BD e BT conforme destacado nas figuras 2 e 3, para os grupos PCI e IN. Dosagens de Amônia, Glicose e Lactato não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

3.3 – Resultados da análise histológica pós-isquemia de 90 minutos e reperfusão de 24 horas

A análise dos dados histopatológicos (através de ajuste de modelo linear generalizado com distribuição gama para avaliar efeito de grupos) permitiu observar diferenças significativas ($p < 0,05$) para escore de Suzuki modificado nas amostras de FI nos grupos IN e PCI (Figura 4) em relação aos demais grupos. Comparando itens individuais do ESM entre os grupos, através

do teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, identificou-se significância ($p < 0,05$) para itens NZ2 e NZ3 e para ILN nas amostras de FI do grupo IN.

Os demais aspectos individuais dos escores histopatológicos avaliados (Congestão Sinusoidal (CS), Degeneração Hidrópica (DH), Necrose de Zona 1 (NZ1) e Esteatose (E)) não apresentaram diferenças significativas entre os espécimes de fígados submetidos ao processo isquêmico (FI). Sob ponto de vista de análise do método aplicado no experimento, a análise comparativa somente entre os espécimes não isquêmicos (FNI) de todos os grupos não demonstrou haver qualquer diferença com significância estatística para todas as comparações.

Quando analisado, de forma pareada, o ESM entre amostras de zona isquêmica (FI) e não isquêmica (FNI), dentro dos mesmos grupos, foram demonstradas marcadas significâncias estatísticas para os grupos IN ($p=0,028$) e PCI ($p=0,046$), enquanto nos grupos C ($p=1,0$), HT ($p=0,75$) e PCI+HT ($p=0,470$) não ocorreram diferenças significativas entre os espécimes FI e FNI.

Discussão

No presente estudo avaliamos os efeitos dos processos de IRH, monitorados durante sua aplicação através de parâmetros fisiológicos transoperatórios, em 24 horas após o insulto inicial, através de análises bioquímicas, histopatológicas e diferentes combinações de mecanismos protetores (HT, PCI, PCI+HT), associando o princípio do zoneamento hepático na análise histopatológica (Fórmula 1 e Tabela 1). Considerando a já esperada grave lesão produzida pelos 90 minutos de isquemia hepática deste tipo de modelo, os achados bioquímicos e histopatológicos obtidos apontam que, neste cenário extremo, somente os animais submetidos à HT, com ou sem aplicação de PCI, obtiveram resultados histopatológicos com evidente citoproteção, se comparados aos demais grupos (Figura 04). Animais submetidos à IN, com ou

sem PCI, têm piores resultados no ESM em relação aos animais submetidos à HT, com ou sem PCI. Considerando os achados das análises bioquímicas em relação aos achados do ESM em cada grupo, percebe-se que os grupos C, HT e PCI+HT se distinguem dos grupos IN e / ou PCI no que tange as dosagens de ALT, AST, BD, BT, LDH, FA e GGT, ou seja, os maiores escores do ESM estiveram associados às maiores alterações bioquímicas destes marcadores.

Nenhuma referência foi encontrada na literatura com modelo de IRH que combinasse 90 minutos de isquemia, associados à aplicação de hipotermia e / ou pré-condicionamento e posterior evolução de 24 horas durante a fase de reperfusão. Sendo assim podemos apenas inferir algumas considerações sobre os nossos achados e os disponíveis em outros modelos de IRH, em que a fase de isquemia e / ou a fase de reperfusão e / ou os mecanismos protetores testados foram distintos e / ou ocorreram em tempos diferentes. Peralta e colaboradores ⁽³¹⁾, em modelo de PCI associado a 90 minutos de isquemia e mesmo tempo de reperfusão, associado com infusão prévia combinada de várias substâncias, registraram efeito protetor do PCI, tanto a nível hepático como também pulmonar. Jin e colaboradores ⁽³²⁾ em modelo de PCI com 60 minutos de isquemia e até 24 horas de reperfusão demonstrou efeito protetor do PCI, com redução nos níveis enzimáticos, redução dos achados de apoptose e melhora do ILN. Adam e colaboradores ⁽³³⁾ em modelo de PCI com 60 minutos de isquemia e 03 horas de reperfusão também demonstraram efeito benéfico do PCI com achados de níveis elevados de glicogênio hepático quando comparado ao grupo sem PCI, concluindo que os níveis de glicogênio teriam relação diretamente inversa a duração da isquemia. Li e colaboradores ⁽³⁴⁾, em modelo de PCI farmacológico (minociclina) com 90 minutos de isquemia e até 24 horas de reperfusão, demonstrou pico de alterações enzimáticas (AST, ALT, LDH) em 06 horas de reperfusão, marcadas alterações histopatológicas a partir de 06 horas de reperfusão com progressivo declínio destas somente após 24 horas de evolução, além de efeito citoprotetor estatisticamente significativo no grupo submetido à PCI.

Em nosso estudo, os marcadores bioquímicos como Bilirrubinas (BD e BT), Transaminases (ALT e AST), Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transpeptidase (GGT), demonstram acentuada lesão orgânica nos grupos normotérmicos (IN, PCI), se comparados aos hipotérmicos (HT, PCI +HT) (Figuras 2 e 3).

Quando analisado separadamente, neste modelo específico, o mecanismo de PCI não foi efetivo em promover citoproteção hepática, sendo os escores dos animais submetidos ao PCI semelhantes ao do grupo IN, tanto do ponto de vista histopatológico, como também bioquímico e fisiológico transoperatório. Achados semelhantes foram descritos por Steenks e colaboradores ⁽³⁵⁾, em modelo animal comparando PCI com isquemia intermitente em fígados esteatóticos, onde os autores descrevem um efeito protetor menor do PCI comparado à isquemia intermitente ou contínua e argumentam que tais achados poderiam ser explicados pelos efeitos negativos das citocinas e outras moléculas inflamatórias liberadas pelo lobo isquêmico submetido ao PCI sobre os lobos não submetidos. Também Chu e colaboradores ⁽³⁶⁾, em revisão sistemática, descrevem achados conflitantes de alguns estudos que avaliaram o efeito do PCI sobre fígados esteatóticos submetidos à IRH, sugerindo que futuros estudos experimentais deveriam tentar emular de forma ainda melhor o cenário clínico usual para fornecer precisa compreensão sobre os mecanismos e efeitos do PCI e tentar identificar algum grupo de pacientes em particular que possa se beneficiar do PCI. Possivelmente este cenário em que este método seja mais efetivo não inclua tempos de isquemia tão prolongados como o deste estudo. Deve ser destacado também que estudos randomizados em humanos falharam em demonstrar estes efeitos benéficos do PCI identificados em modelos experimentais ^(37, 38)

A Classificação Histopatológica de Suzuki Modificada e o Escore de Suzuki Modificado, variantes elaboradas a partir de suas propostas iniciais de seus autores, foram utilizados neste projeto para graduar e comparar os achados histopatológicos, permitindo, com esta expansão de

seus indicadores originais, especialmente relacionada com a divisão das áreas de necrose em zonas, a partir do conhecimento prévio relativo ao zoneamento funcional deste órgão, obter finalmente dados mais precisos em relação aos efeitos da IRH e de cada mecanismo de proteção testado, calculando desta forma um escore de lesão mais abrangente e ao mesmo tempo mais detalhado ao se analisar as diferentes áreas histológicas de necrose em separado. Originalmente a tabela de Suzuki e colaboradores ⁽²⁹⁾ considerava um único valor para o item necrose e não incluía o grau de esteatose (E). Não houve achado significativo para NZ1 em todos os grupos, porém os achados para NZ2 e NZ3 são significativos isoladamente para Grupo IN. O mesmo achado de significância isolada no Grupo IN se repete para o item ILN do escore. Especula-se que a ausência de significância para os achados de NZ1 no presente estudo sejam devidos à proximidade desta zona com a tríade portal, local com maior perfusão tecidual.

As análises complementares, entre os parâmetros fisiológicos transoperatórios dos diferentes grupos ($p>0,05$), entre as amostras FNI dos diferentes grupos ($p>0,05$) e também a análise pareada entre amostras FI e FNI dentro de cada grupo ($p<0,05$) usando a CHSM e o ESM, fazendo com que cada animal fosse também controle de si mesmo e dos demais, permitiram observar o rigor metodológico empregado, uma vez que diferentes grupos têm parâmetros fisiológicos transoperatórios semelhantes, além da efetividade do modelo experimental estendido, modificado a partir do modelo agudo original e empregado na condução deste projeto. As modificações desenvolvidas a partir da técnica original do modelo de IRH ⁽²⁸⁾, especialmente relacionadas ao método anestésico, conforme já relatado por Steenks e colaboradores ⁽³⁵⁾, além da incisão cirúrgica e cuidados trans e pós-operatórios, permitiram obter um modelo experimental estendido viável de IRH com 24 horas de evolução após severo insulto isquêmico original, possibilitando então analisar tardiamente os efeitos dos diferentes métodos

de citoproteção citados anteriormente, comparando-os entre si e conjuntamente neste projeto científico.

Neste cenário extremo de IRH do presente modelo, avaliado após 24 horas de evolução, conclui-se que somente os grupos submetidos à hipotermia tópica transoperatória demonstraram efeito hepatoprotetor esperado.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os membros deste grupo de pesquisa, além do pessoal da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, pelo apoio durante a execução do estudo e análise dos dados.

Declaração de conflitos de interesse dos autores: Os autores certificam que NÃO têm afiliações ou envolvimento em nenhuma organização ou entidade com interesse financeiro (tais como honorários, subsídios educacionais, participação como oradores, filiação, emprego, consultorias, propriedade de ações, ou outras participações societárias e declarações de especialistas ou licenciamento de patentes), ou interesse não financeiro (como relações pessoais ou profissionais, afiliações, conhecimento ou crenças) no objeto ou materiais discutidos no presente artigo.

Referências

1. Abu-Amara M, Yang S, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory enetworks-A review. *Liver Transplantation*. 2010;16(9):1016-32.
2. Bismuth H, Eshkenazy R, Arish A. Milestones in the Evolution of Hepatic Surgery. *Rambam Maimonides Medical Journal*. 2011;2(1):1-11.
3. Jochmans I, Meurisse N, Neyrinck A, Verhaegen M, Monbaliu D, Pirenne J. Hepatic ischemia/reperfusion injury associates with acute kidney injury in liver transplantation: Prospective cohort study. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2017;23(5):634-44.
4. Prieto I, Monsalve M. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning. *Redox Biol*. 2017;12:1020-5.
5. Quesnelle K, Bystrom P, Toledo-Pereyra L. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Archives of Toxicology*. 2015;89(5):651-7.
6. van Riel W, van Golen R, Reiniers M, Heger M, van Gulik T. How much ischemia can the liver tolerate during resection?. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016;5(1):58-71.
7. Patel R, Lang J, Smith A, Crawford J, J. Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World*. 2014;6(1):1-8.
8. Cannistra M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *International journal of surgery (London, England)*. 2016;33 Suppl 1:S57-70.
9. Talebi Z, Peyvandi H, Dabbagh A. Cellular and Molecular Mechanisms in Perioperative Hepatic Protection: A Review of Current Interventions. *Journal of Cellular & Molecular Anesthesia*. 2017;2(2):82-93.
10. Jaeschke H, Woolbright B. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplantation Reviews*. 2012;26(2):103-14.
11. Suyavaran A, Thirunavukkarasu C. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion-induced injury: Update on molecular and future perspectives. *Hepatology Research*. 2017;47(1):31-48.
12. Abdo EE, Figueira ERR, Rocha-Filho JA, Chaib E, D'Albuquerque LAC, Bacchella T. Preliminary results of topical hepatic hypothermia in a model of liver ischemia/ reperfusion injury in rats. *Arquivos de gastroenterologia*. 2017;54(3):246-9.
13. Khodosovsky MN. Effects of Hypoxic Preconditioning on the Mechanisms of Oxygen Transport and Oxidative Damage during Hepatic Ischemia-Reperfusion Syndrome in Rabbits. *Int J Phys Pathophys*. 2017;8(2):165-75.
14. Bystrom P, Foley N, Toledo-Pereyra L, Quesnelle K. Ischemic preconditioning modulates ROS to confer protection in liver ischemia and reperfusion. *EXCLI Journal*. 2017;16:483-96.
15. Song X, Zhang N, Xu H, Cao L, Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *International journal of biological sciences*. 2012;8(5):707-18.
16. Reyes-Gordillo K, Shah R, Muriel P. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Current and future therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1-2.

17. Olthof PB, Reiniers MJ, Dirkes MC, Van Gulik TM, Heger M, Van Golen RF. Protective mechanisms of hypothermia in liver surgery and transplantation. *Molecular medicine*. 2015;21:833-46.
18. Tapuria N, Junnarkar S, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR. Haemoxygenase modulates cytokine induced neutrophil chemoattractant in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7518-35.
19. Lentsch AB. Regulatory mechanisms of injury and repair after hepatic ischemia/reperfusion. *Scientifica*. 2012;2012:1-14.
20. Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol*. 2013;59(5):1094-106.
21. Alkozai E, Lisman T, Porte R, Nijsten M. Early elevated serum gamma glutamyl transpeptidase after liver transplantation is associated with better survival. *F1000Research*. 2014;3(85):1-11.
22. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Kruel CD, Corso CO. Topical liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(4):262-6.
23. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, et al. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26(3):194-201.
24. Longo L, Sinigaglia-Fratta LX, Weber GR, Janz-Moreira A, Kretzmann NA, Grezzana-Filho Tde J, et al. Hypothermia is better than ischemic preconditioning for preventing early hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Annals of hepatology*. 2016;15(1):110-20.
25. McCafferty K, Forbes S, Thiernemann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Disease models & mechanisms*. 2014;7(12):1321-33.
26. van Golen RF, Reiniers MJ, Heger M, Verheij J. Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models. *J Hepatol*. 2015;62(4):975-7.
27. Nadarajah L, Yaqoob MM, McCafferty K. Ischemic conditioning in solid organ transplantation: is it worth giving your right arm for? *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2017;26(6):467-76.
28. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001;72(9):1486-90.
29. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-72.
30. Colnot S, Perret C. Liver Zonation. In: Monga SPS, editor. *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Boston, MA: Springer US; 2011. p. 7-16.
31. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999;30(6):1481-9.
32. Jin LM, Liu YX, Zhou L, Xie HY, Feng XW, Li H, et al. Ischemic preconditioning attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2010;77(3):136-46.
33. Adam AN. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *International journal of general medicine*. 2014;7:483-9.

34. Li Y, Li T, Qi H, Yuan F. Minocycline protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Biomedical reports*. 2015;3(1):19-24.
35. Steenks M, van Baal MC, Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Teo MH, et al. Intermittent ischaemia maintains function after ischaemia reperfusion in steatotic livers. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(4):250-61.
36. Chu MJ, Vather R, Hickey AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Impact of ischaemic preconditioning on experimental steatotic livers following hepatic ischaemia-reperfusion injury: a systematic review. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2015;17(1):1-10.
37. O'Neill S, Leuschner S, McNally SJ, Garden OJ, Wigmore SJ, Harrison EM. Meta-analysis of ischaemic preconditioning for liver resections. *The British journal of surgery*. 2013;100(13):1689-700.
38. Selzner N, Boehnert M, Selzner M. Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2012;26(2):115-24.

Imagens

Fórmula 1: Calculo do ESM

$$ESM = CS + DH + ILN + E + \left(\frac{NZ1 + NZ2 + NZ3}{3} \right)$$

Fórmula 1: ESM: Escore de Suzuki Modificado, CS: Congestão Sinusoidal, DH: Degeneração Hidrópica, ILN: Infiltrado Leucocitário Neutrofílico, NZ1: Necrose de Zona 1, NZ2: Necrose de Zona 2, NZ3: Necrose de Zona 3.

Figura 1:

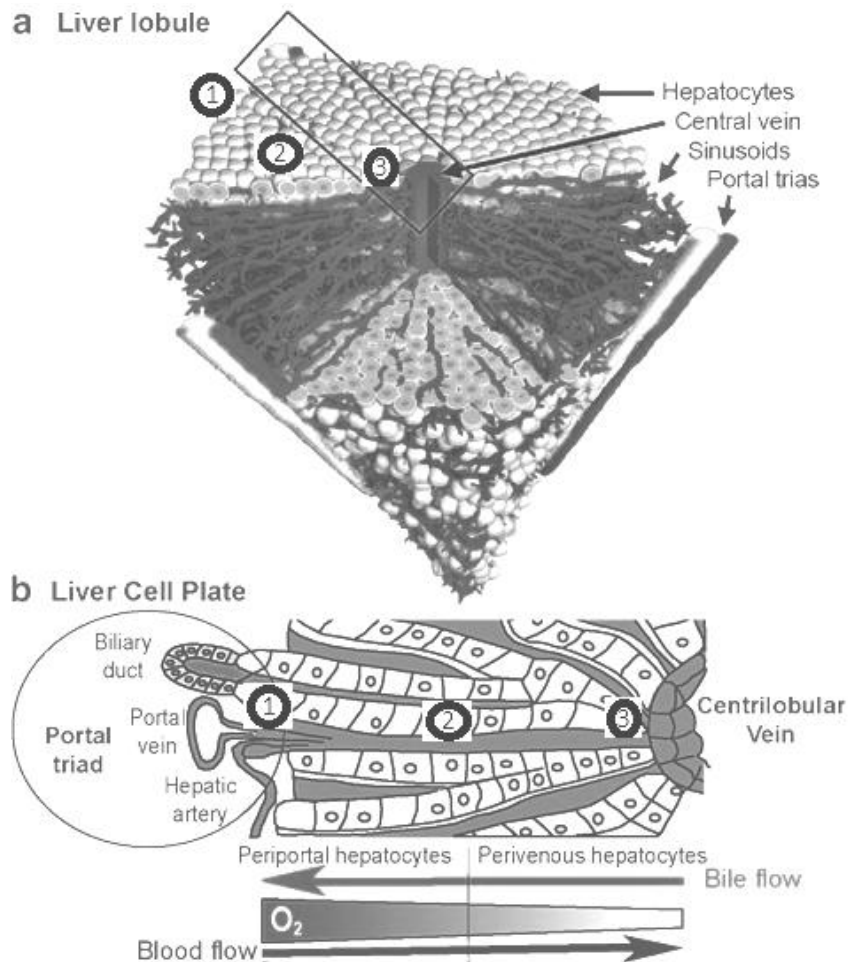


Figura 1: Representação esquemática tridimensional do zoneamento hepático. Zona 1, próxima a tríade portal; Zona 2, região intermediária sinusoidal; Zona 3, próxima veia centro lobular.

Modificado de Colnot S, 2011.

Figura 2:

Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT) e Gama Glutamil Transpeptidase (GGT)

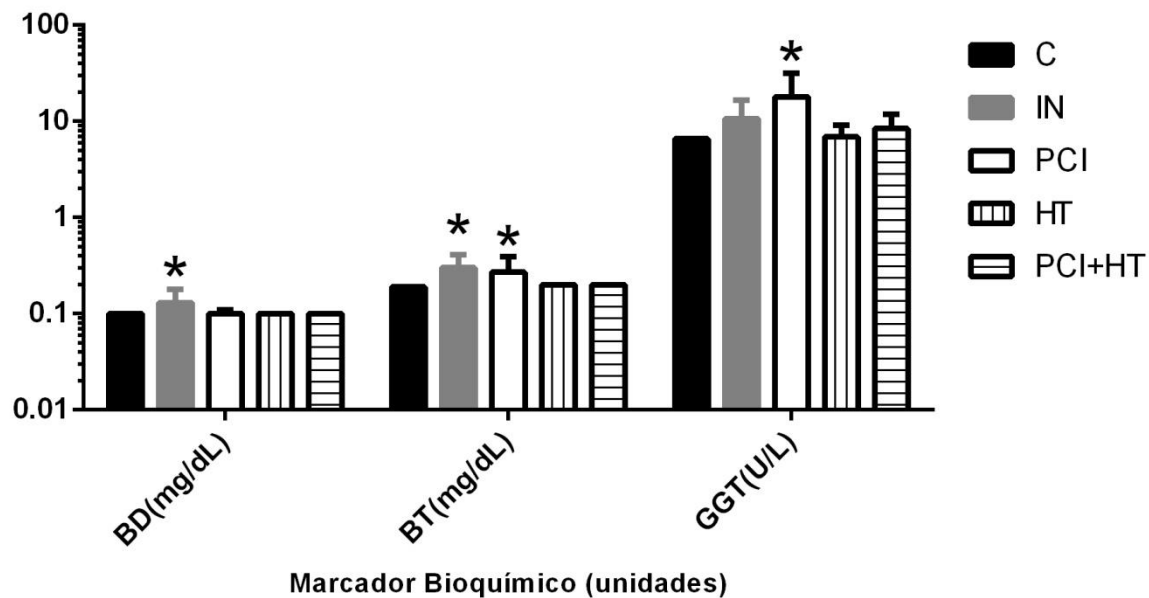


Figura 2 - Níveis de Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Total (BT) e Gama Glutamil Transpeptidase (GGT) no plasma de 24 horas para todos os grupos: Controle (C), Isquemia Normotérmica (IN), Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI), Hipotermia Tópica (HT) e Pré-Condicionamento Isquêmico + Hipotermia Tópica (PCI+HT). Dados apresentados sob forma de média e desvio padrão, convertidos a log 10. *Análise através de ajuste de Modelo Linear Generalizado com Distribuição Gama para avaliar efeito de grupos revelou $p < 0,05$ para grupos IN e PCI.

Figura 3:

Fosfatase Alcalina (FA), Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

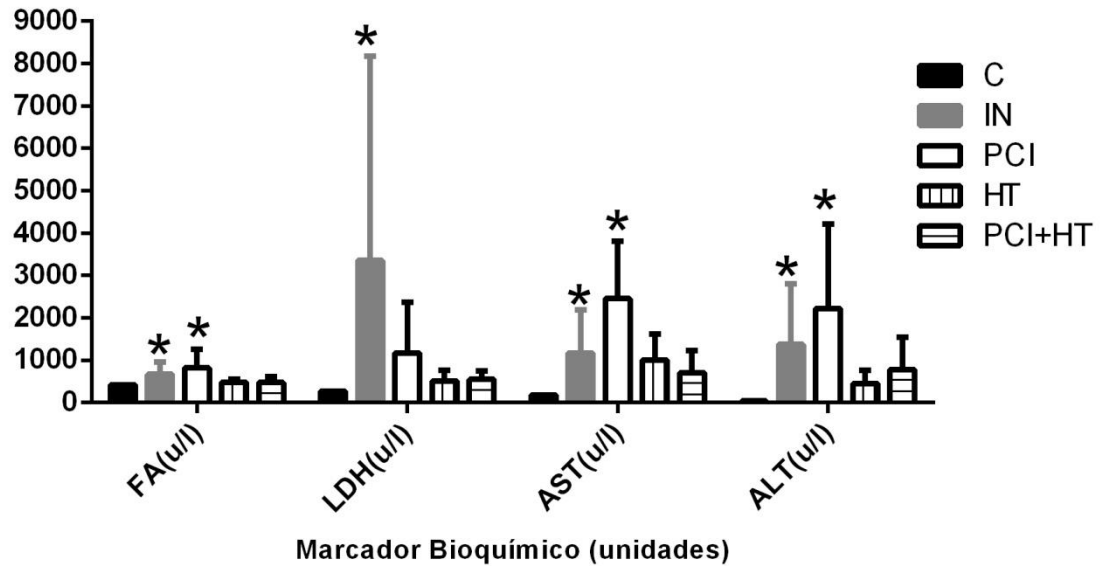


Figura 3 - Níveis de Fosfatase Alcalina (FA), Lactato Desidrogenase (LDH), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) no plasma de 24 horas para todos os grupos: Controle (C), Isquemia Normotérmica (IN), Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI), Hipotermia Tópica (HT) e Pré-Condicionamento Isquêmico + Hipotermia Tópica (PCI+HT). Dados apresentados sob forma de média e desvio padrão. *Análise através de ajuste de Modelo Linear Generalizado com Distribuição Gama para avaliar efeito de grupos revelou $p < 0,05$ para grupos IN e PCI.

Figura 4

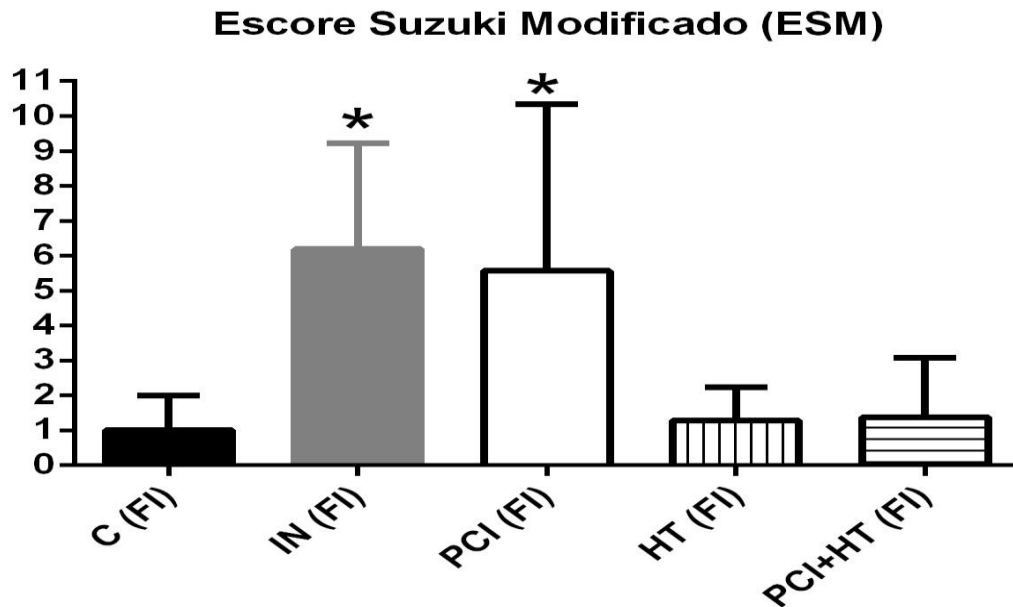


Figura 4 - Escore de Suzuki Modificado para amostras FI de todos os grupos: Controle (C), Isquemia Normotérmica (IN), Pré-Condicionamento Isquêmico (PCI), Hipotermia Tópica (HT) e Pré-Condicionamento Isquêmico + Hipotermia Tópica (PCI+HT). Dados apresentados sob forma de média e desvio padrão. *Análise através de ajuste de Modelo Linear Generalizado com Distribuição Gama para avaliar efeito de grupos revelou $p < 0,05$ para grupos IN e PCI.

Tabelas

Tabela 1: Classificação Histopatológica de Suzuki Modificada (CHSM)

Escore	Congestão Sinusoidal (CS)	Degeneração Hidrópica (DH)	Infiltrado Neutrófilico (ILN)	Esteatose (E)	Necrose de Zona 1 (NZ1)	Necrose de Zona 2 (NZ2)	Necrose de Zona 3 (NZ3)
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	Dilatação de Veia Centrolobular	Mínima	Mínimo	Até 30%	Necrose Celular Isolada	Necrose Celular Isolada	Necrose Celular Isolada
2	Dilatação de Veia Centrolobular e de Sinusoides em algumas Zonas 3	Leve	Leve	30 a 60%	Até 30%	Até 30%	Até 30%
3	Dilatação de Veia Centrolobular e de Sinusoides na maioria das Zonas 3	Moderada	Moderado	maior de 60%	30 a 60%	30 a 60%	30 a 60%
4	Dilatação de Veia Centrolobular e de Sinusoides nas Zonas 2 e 3	Severa	Severo		Maior de 60%	Maior de 60%	Maior de 60%

Artigo em Inglês

Versão completa publicada na Acta Cirúrgica Brasileira
(http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502018001000924&lng=en&nrm=iso&tlng=en

ou

<http://www.scielo.br/pdf/acb/v33n10/1678-2674-acb-33-10-00924.pdf>)

Topical hepatic hypothermia associated with ischemic preconditioning. Histopathological and biochemical analysis of ischemia reperfusion damage in a 24 hour model¹

Gémerson Gabiatti^I, Tomaz de Jesus Maria Grezzana-Filho^{II}, Carlos Thadeu Schmidt Cerski^{III}, Carlos Bofill^{IV}, Stella Valle^V, Carlos Otávio Corso^{VI}

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program of Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study, technical procedures, acquisition and analysis of data, manuscript writing.

^{II}PhD, Liver Transplantation Surgeon, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Department of Surgery, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study, analysis of data, manuscript writing.

^{III}PhD, Associate Professor, Department of Pathology, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Histopathological examinations.

^{IV}Graduate student, Faculty of Medicine, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Technical procedures, acquisition of data.

^VCoordinator, Laboratory of Veterinary Clinical Analysis (LACVet), Porto Alegre-RS, Brazil. Acquisition of data.

^{VI}PhD, Associate Professor, Postgraduate Program of Surgical Sciences, Department of Surgery, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Manuscript writing, critical revision, final approval.

Abstract

Purpose: To develop a new 24 hour extended liver ischemia and reperfusion (LIR) model analyzing the late biochemical and histopathological results of the isolated and combined application of recognized hepatoprotective mechanisms. In addition, we used a new stratification with zoning to classify the histological lesion.

Methods: A modified animal model of severe hepatic damage produced through 90 minutes of segmental ischemia (70% of the organ) and posterior observation for 24 hours of reperfusion, submitted to ischemic preconditioning (IPC) and topical hypothermia (TH) at 26°C, in isolation or in combination, during the procedure. Data from intraoperative biometric parameters, besides of late biochemical markers and histopathological findings, both at 24 hours evolution time, were compared with control (C) and normothermic ischemia (NI) groups.

Results: All groups were homogeneous with respect to intraoperative physiological parameters. There were no losses once the model was established. Animals subjected to NI and IPC had worse biochemical (gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, direct bilirubin, and total bilirubin) and histopathological

scores (modified Suzuki score) compared to those of control groups and groups with isolated or associated TH ($p < 0.05$).

Conclusion: The new extended model demonstrates liver ischemia and reperfusion at 24 hour of evolution and, in this extreme scenario, only the groups subjected to topical hypothermia, combined with ischemic preconditioning or alone, had better outcomes than those subjected to only ischemic preconditioning and normothermic ischemia, reaching similar biochemical and histopathological scores to those of the control group.

Key words: Ischemic Preconditioning. Ischemia. Reperfusion. Liver. Hypothermia. Rats.

Introduction

Liver ischemia and reperfusion (LIR) has been the subject of intense study in recent decades. LIR is involved in many healthcare scenarios, including trauma, hemorrhagic shock and resuscitation, septic shock, cardiac failure, respiratory insufficiency, hepatectomy and liver transplantation¹. With the introduction of surgical control techniques of the hepatic vascular pedicle, today eventually still necessary during hepatic surgical procedures², ischemia and reperfusion have been considered key elements in postoperative morbidity and mortality since severe complications such as liver dysfunction and/or failure can result from this reperfusion process and injure other organs and systems³. The major mechanisms of such injuries are the generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)⁴ together with the infiltration of polymorphonuclear leukocytes among other mechanisms of cellular injury⁵. In normothermic conditions, the liver can tolerate clamping of the vessels of its pedicle for approximately 1 hour when the liver parenchyma is normal, whereas additional protection is required with diseased livers⁶.

To minimize the effects of LIR, several methods have been studied⁷⁻⁹, including ischemic preconditioning (IPC)^{10,11} and topical hypothermia (TH)¹². The reduction of oxidative stress with the application of IPC is multifactorial^{13,14}, with the activation of specific genes, production of antioxidant enzymes and production of nitric oxide, the latter being a potent vasodilator with important antagonist effects during the ischemia phase^{15,16}. Hypothermia achieves its objectives by inducing hypometabolism via suppressing mitochondrial activity, as an essential part of its cytoprotective effect^{17,18}.

The aim of this study was to compare the association of IPC with TH compared to either method alone in an LIR model with extreme injury, monitoring intraoperative physiological parameters¹⁹ and their possible histopathological²⁰ and biochemical²¹ consequences measured at

24 hours of reperfusion after ischemic insult. The application of TH, alone or in conjunction with IPC, has already been evaluated by our group in an acute animal model with partial 90-minute liver ischemia followed by 120 minutes of reperfusion and immediate euthanasia, with the demonstration of its protective effects through the reduction of inflammatory markers such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-12; an increase in anti-inflammatory cytokines such as IL-10; increased levels of nitric oxide; and elevated expression of Nrf2, Keap1, and NQO1 genes; all are related to antioxidant effects²²⁻²⁴.

Several modifications have been made to the original partial ischemia model, especially related to the anesthesia method, surgical incision, and intra- and post-operative care, thus allowing an experimental model with extended observation time of 24 hours of reperfusion, enabling the analysis of the late effects of different cytoprotective methods (IPC and TH). The combined application of IPC and TH in a model with this time duration, both with ischemia and reperfusion, has not been described to date; however, it is fully justified considering the therapeutic plateau reached regarding the pursuit of proven effective options related to the control of experimental LIR. It should be noted that it carries a greater likelihood of clinical applicability, possibly the critical point of the current studies related to LIR, namely the application and reproduction of experimental studies in clinical care models²⁵⁻²⁷.

Methods

This study, identified by number 08486, was approved by the Bioethical Committee and funded by the Post-Graduation Group of the HCPA-UFRGS, which adheres to the rules of the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS).

Thirty-three male Wistar rats (mean weight, 279g; mean age, 65 days) were divided into five groups: control (C; n = 5), normothermic ischemia (NI = 7), topical hypothermia at 26°C (TH; n

= 7), ischemic preconditioning (IPC; n = 7), and ischemic preconditioning + topical hypothermia at 26°C (IPC+TH; n = 7).

Anesthesia protocol

The animals were subjected to inhalation anesthesia administered through a facial cannula connected to a respirator, which maintained a constant oxygen flow of 0.5 L per minute and a mixture of anesthesia with isoflurane 1–2%. The upper portion of the abdomen and the right cervical region were trichotomized and prepared with aqueous iodine solution.

Monitoring was performed through a catheter installed in the right carotid artery (PE-50; Portex, Kent, England) to control the mean blood pressure (MBP) during the entire procedure. In addition, oximetry was performed through an external sensor applied to the animal's tail, that enabled also the recording of heart rate (HR). Saline solution (NaCl 0.9%, 2 mL/kg/h) was continuously infused into the carotid artery to replace the basal needs, compensate for hydroelectrolytic losses and maintain catheter patency. The body temperature was monitored by a rectal digital thermometer and maintained at 36–37.5°C with the aid of a heating device of the surgical table and by external lamp heating.

Surgical procedure

Access to the abdominal cavity was attained through a median laparotomy. In group C, the hepatic lobes were isolated without any additional procedure. In the groups with ischemia (NI, IPC, TH, and IPC+TH), the liver was isolated in the operative field and an atraumatic neurosurgical clip was used to interrupt the portal and arterial blood flow to the left and middle lobes (70% of the hepatic mass) for 90 minutes, while the right and caudate lateral lobes remained uninterrupted. In the groups with IPC, the left and median lobes of the liver were

isolated in the operative field and submitted to 10 minutes of ischemia, followed by reperfusion for another 10 minutes before the final clamping for 90 minutes.

In the hypothermia groups, the hepatic lobes were isolated in the operative field using a concha-like thermo-insulating styrofoam device and cooled with cold physiological solution dripped onto the surface of the ischemic lobes during the 90-minute ischemia period. The excess liquid was removed by aspirators, preventing the freezing liquid from penetrating the abdominal cavity and causing systemic hypothermia in the animals, similar to the model developed by Biberthaler *et al.*²⁸. A flexible microprobe (TI-23; Braintree Scientific) was implanted into the left lobe and the intrahepatic temperature (IHT) was monitored continuously to reach 26°C locally (Thermalert Monitoring Thermometer TH-5; Boston Scientific). In the other groups, IHT was also recorded at the same insertion point and with the same measurement duration.

During the entire procedure, at 15-minute intervals, vital physiological parameters such as HR, MBP, respiratory rate (RR), systemic temperature (ST), and intrahepatic temperature (IHT) were recorded. In all groups, the same parameters were recorded 1 minute after declamping of the pedicle (91-minute procedure). The percentage of isoflurane in the inhalational anesthetic mixture was also recorded during all procedures, as was the temperature of the surgical room.

Post-anesthesia procedures and sampling

After 90 minutes of ischemia, the metal clips of the pedicle were removed, and the organ was reperfused. The abdominal wall was closed, the surgical incision infiltrated with 0.1 mL of 0.5% bupivacaine solution in 0.9 mL of saline solution, and the animal was transferred to an incubator for anesthesia recovery.

At the end of 24 hours, the rats were anesthetized again with isoflurane inhalation as described in the previous procedure. The abdomen was opened and the animals were sacrificed by cardiac puncture and exsanguinating blood aspiration. The liver was removed and stored; a fraction was fixed in formalin and another fraction was frozen in nitrogen and kept in a freezer at -80°C. The blood was immediately centrifuged and the plasma obtained frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C. The liver samples were identified from the area in which they originated in each experiment: ischemic (IL), belonging to the intervention zone (left lobe and median), and non-ischemic (NIL), belonging to the hepatic segment that was protected against ischemia by pedicular clamping and the application of hypothermia (right lobe).

Plasma analysis

Serum biochemistry of the stored material was performed by the certified and specialized laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the UFRGS using a WIENER-CM200 with imported reagents specific for the animal used (WIENER and RANDOX). The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), ammonia (AMO), total bilirubin (TB) and direct bilirubin (DB), alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), glucose (GLU), lactate (LAC), and lactate dehydrogenase (LDH) were assessed.

Histopathological analysis

The liver samples, divided into IL and NIL from the same animal, were fixed in 10% formalin and stained with hematoxylin-eosin. The blinded evaluation of each specimen was performed by the pathology service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre using an optical microscope and assigning a value to the morphological changes observed following the original

model proposed by Suzuki *et al.*²⁹ to examine the findings of sinusoidal congestion (SC), hydropic degeneration (HD), neutrophilic leukocyte infiltrate (NLI), and hepatocellular necrosis. The rating of steatosis (S) was added to these parameters and the analysis in the necrosis area was improved (Modified Histopathological Classification of Suzuki [MHCS]), performed in a stratified way using liver zoning (Figure 1)³⁰, in which each lobe is divided into three zones: zone 1 (NZ1), starting from the area next to the triad portal; Zone 2 (NZ2), passing by the sinusoidal intermediate region; and Zone 3 (NZ3), in the region near the central lobular vein (Table 1).

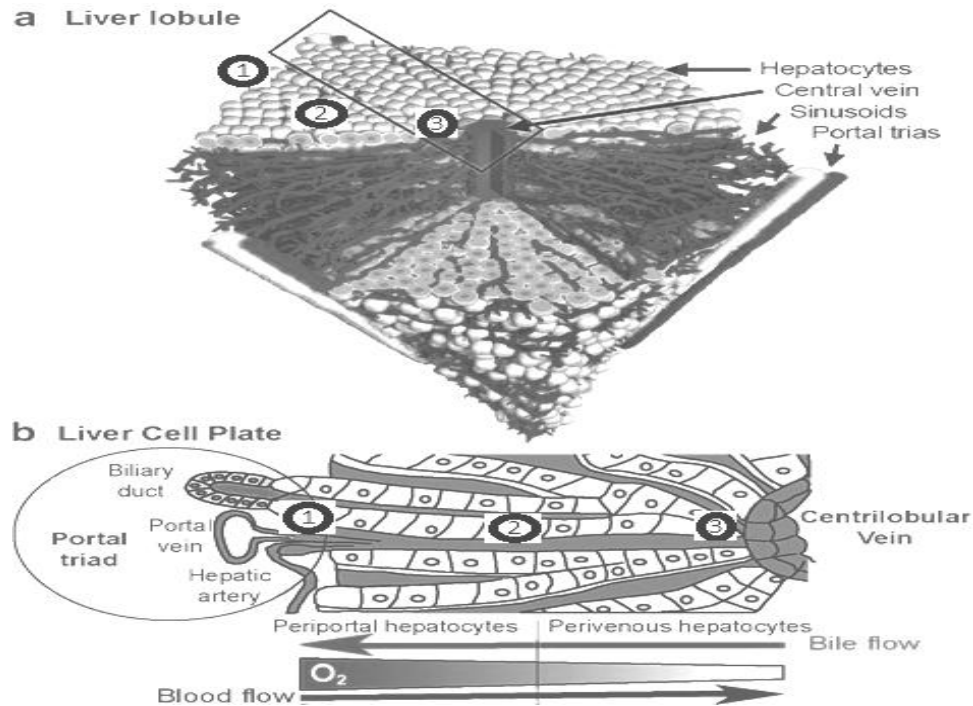


Figure 1 - Schematic representation of three-dimensional liver zonation. Zone 1, next to the portal triad; Zone 2, intermediate sinusoidal region; Zone 3, proximal central lobular vein. Modified from Colnot S, 2011.

Table 1 - Modified Histopathological Classification of Suzuki (MHCS).

Score	Sinusoidal congestion (SC)	Hydropic degeneration (HD)	Neutrophilic infiltrate (NLI)	Steatosis (S)	Zone 1 necrosis (NZ1)	Zone 2 necrosis (NZ2)	Zone 3 necrosis (NZ3)
0	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
1	Dilation of the centrilobular vein	Minimal	Minimal	Up to 30%	Isolated cell necrosis	Isolated cell necrosis	Isolated cell necrosis
2	Dilation of the centrilobular vein and sinusoids in some Zone 3 areas	Mild	Mild	30 to 60%	Up to 30%	Up to 30%	Up to 30%
3	Dilation of the centrilobular vein and sinusoids in most Zone 3 areas	Moderate	Moderate	Greater than 60%	30 to 60%	30 to 60%	30 to 60%
4	Dilation of the centrilobular vein and sinusoids in Zones 2 and 3	Severe	Severe		Greater than 60%	Greater than 60%	Greater than 60%

The final histological score (Modified Suzuki Score [MSS] was calculated using Formula 1:

$$MSS = SC + HD + NLI + S + \left(\frac{NZ1 + NZ2 + NZ3}{3} \right)$$

Note: MSS, modified Suzuki score; SC, sinusoidal congestion; HD: hydropic degeneration; NLI, neutrophilic leukocyte infiltrate; NZ1, necrosis of Zone 1; NZ2, necrosis of Zone 2; NZ3: necrosis of Zone 3.

All data are presented as mean and standard deviation and were analyzed statistically using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 17 and Statistical Analysis System (SAS) version 9.4 assuming a significance of 0.05 for the tests employed (mixed-model repeated-measures analysis of variance [ANOVA], generalized linear model with a gamma distribution to evaluate the effect of groups and Kruskal-Wallis test for independent samples).

Results

Intraoperative biometric data

The analysis of intraoperative vital signs (mixed-model repeated-measures ANOVA) confirmed the homogeneity of the parameters in the groups. At 91 minutes, 1 minute after declamping of the hepatic pedicle, a uniform decrease occurred in the MBP in all groups, while a rapid elevation of the IHT in the groups submitted to hypothermia. There was no statistically significant difference in ST or other parameters between the intraoperative physiological data of the different groups. The percentage of isoflurane anesthetic mixture remained stable between groups in the different assessed moments without intergroup differences. The variables of weight, age, and surgical room temperature also showed no significant intergroup differences.

Biochemical analysis of plasma after 90 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion

The analysis of biochemical data performed through the adjustment of a generalized linear model with a gamma distribution to evaluate the effect of groups (for asymmetric data) revealed significant differences ($p < 0.05$) in serum GGT, AP, LDH, AST, ALT, DB, and TB (Figures 2 and 3) for the IPC and NI groups. AMO, LAC, and GLU levels were not significantly different between groups.

Direct Bilirubin (DB), Total Bilirubin (TB), and Gamma-Glutamyl Transpeptidase (GGT)

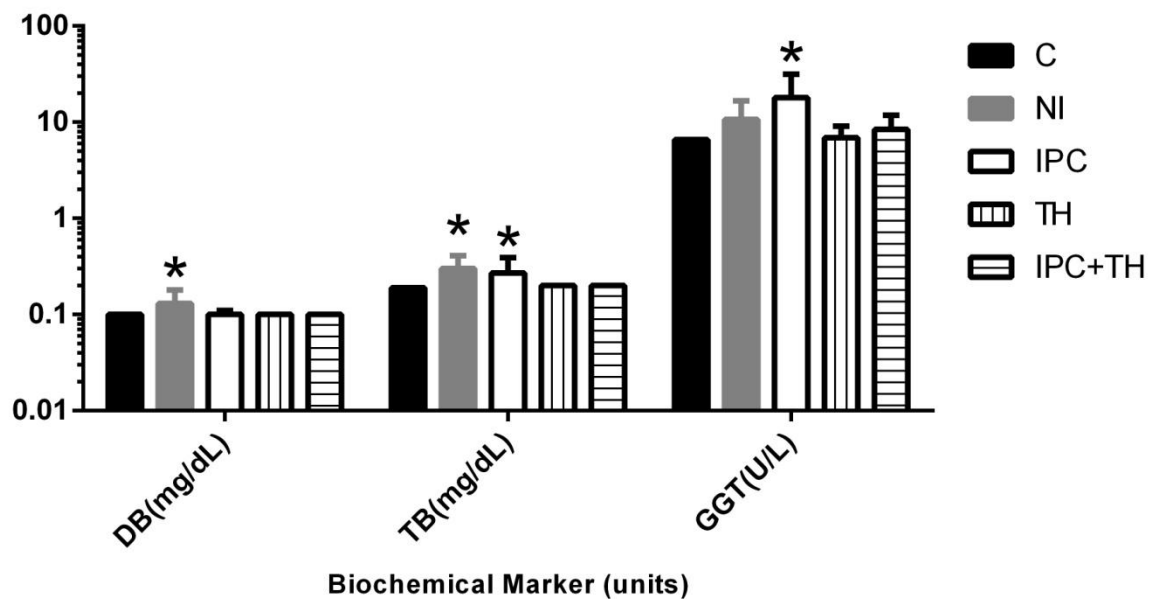


Figure 2 - Levels of DB, TB and GGT in 24-hour plasma for all groups: Control (C), Normothermic Ischemia (NI), Ischemic Preconditioning (IPC), Topical Hypothermia (TH), and Ischemic Preconditioning + Topical Hypothermia (IPC+TH). Data are presented as mean and standard deviation converted to log 10. *Generalized linear model with gamma distribution to assess the group effect revealed $p < 0.05$ for NI and IPC groups.

Alkaline Phosphatase (AP), Lactate Dehydrogenase (LDH), Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT)

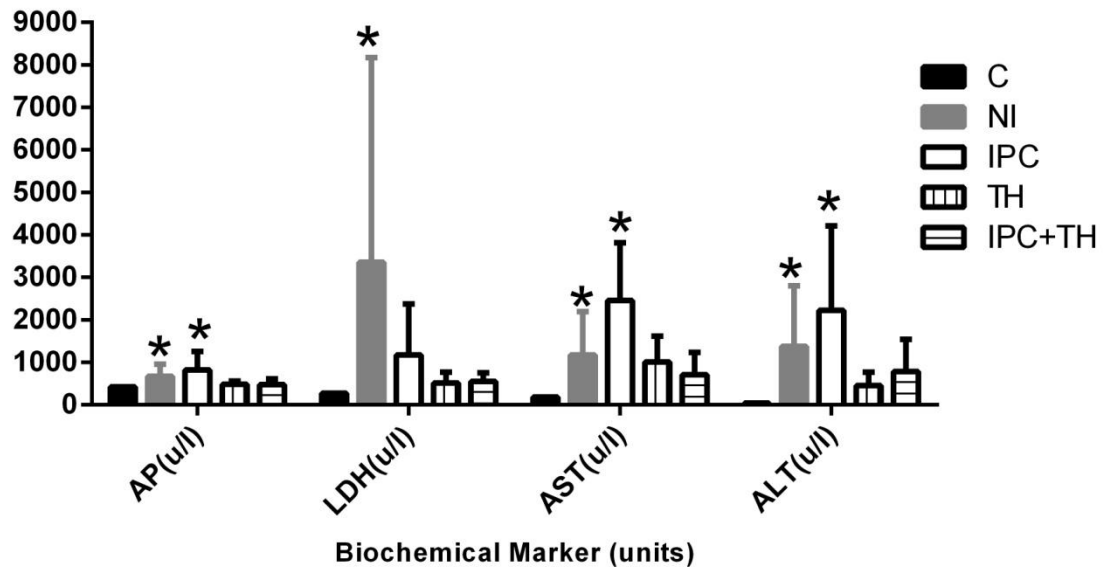


Figure 3 - Levels of AP, LDH, AST and ALT in 24-hour plasma for all groups: Control (C), Normothermic Ischemia (NI), Ischemic Preconditioning (IPC), Topical Hypothermia (TH), and Ischemic Preconditioning + Topical Hypothermia (IPC+TH). Data are presented as mean and standard deviation. *Generalized linear model with gamma distribution to assess the group effect revealed $p < 0.05$ for NI and IPC groups.

Histological analysis after 90 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion

The analysis of the histopathological data (through adjustment of the generalized linear model with a gamma distribution to evaluate the effect of groups) revealed significant differences ($p < 0.05$) for the MSS in IL samples of the NI and IPC groups (Figure 4) compared to those of the other groups. Comparing individual items of the MSS among the groups, using the Kruskal-Wallis test for independent samples, significant differences were observed ($p < 0.05$) for items NZ2 and NZ3 and for NLI in IL samples of the NI group.

The other individual aspects of histopathological scores evaluated (SC, HD, NZ1, and S) showed no significant differences between the IL specimens. Under the point of view of analysis

of the method applied in the experiment, the comparative analysis of the NIL of all groups showed no statistically significant differences in any comparisons.

When analyzed pairwise, the MSS between samples of the IL and NIL zone within the same groups demonstrated marked statistical significance for groups NI ($p = 0.028$) and IPC ($p = 0.046$), but in groups C ($p = 1.0$), TH ($p = 0.75$), and IPC+TH ($p = 0.470$) there were no significant differences between the IL and NIL specimens.

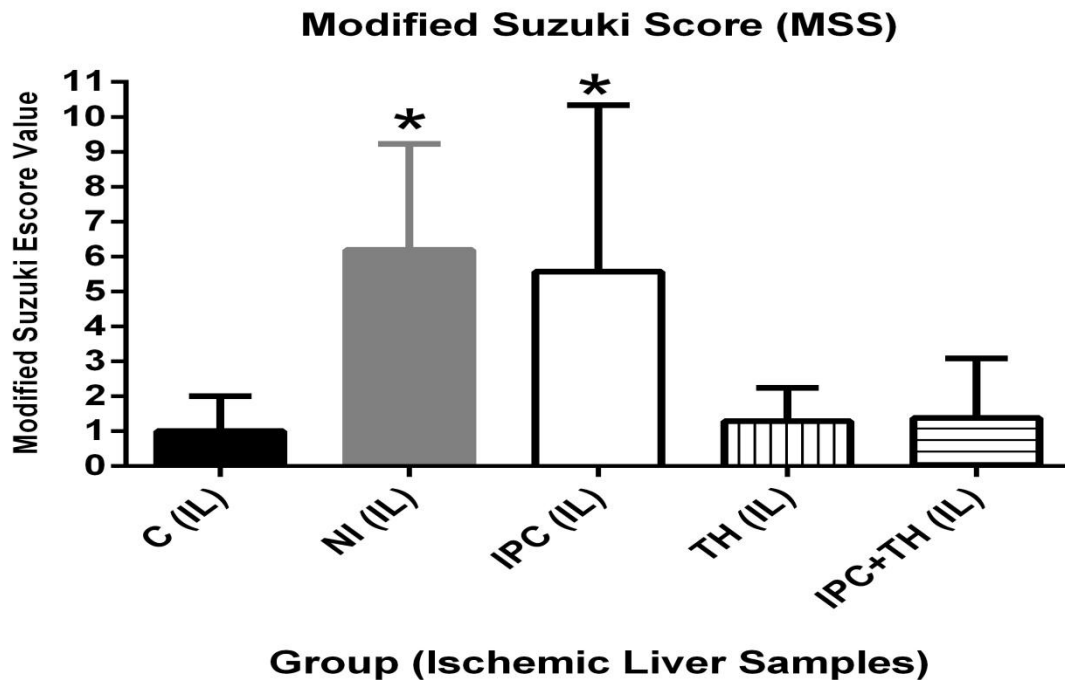


Figure 4 - MSS for ischemic liver samples of all groups: Control (C), Normothermic Ischemia (NI), Ischemic Preconditioning (IPC), Topical Hypothermia (TH), and Ischemic Preconditioning + Topical Hypothermia (IPC+TH). Data are presented as mean and standard deviation. *Generalized linear model with a gamma distribution to assess the group effect revealed $p < 0.05$ for NI and IPC groups.

Discussion

Here we evaluated the effects of LIR monitored during its implementation through intraoperative physiological parameters and 24 hours after the initial insult with assessments of biochemical

and histopathological parameters using different combinations of protective mechanisms (TH, IPC, IPC+TH), associating the principle of zoning in hepatic histopathological analysis (Formula 1, Table 1). Given the already expected serious injury produced by 90 minutes of liver ischemia in this type of model, the obtained biochemical and histopathological findings indicated that, in this extreme scenario, only the animals subjected to TH, with or without the application of IPC, displayed histopathological findings with obvious cytoprotection compared to those in the other groups (Figure 4). Animals subjected to NI with or without IPC displayed worse results in the MSS compared to the animals subjected to TH, with or without IPC. Considering the findings of biochemical analyses in relation to the findings of the MSS in each group, the ALT, AST, DB, TB, LDH, AP, and GGT levels were different in groups C, TH, and IPC+TH compared to those in groups NI and/or IPC, i.e., higher MSS scores were associated with higher biochemical alterations of these markers.

No references were found in the literature with an LIR model that combined 90 minutes of ischemia associated with the application of hypothermia and/or preconditioning and subsequent evolution of 24 hours during the reperfusion phase. So we can only infer some considerations of our findings and those available in other LIR models in which the ischemia phase and/or the reperfusion phase and/or the protective mechanisms tested were distinct and/or occurred at different times. In an IPC model associated with 90 minutes of IR associated with the combined prior infusion of several substances, Peralta *et al.*³¹ reported a protective effect of IPC in the liver and the lungs. In an IPC model consisting of 60 minutes of ischemia and up to 24 hours of reperfusion, Jin *et al.*³² showed a protective effect of IPC with reduced enzyme levels, a reduction in apoptosis, and improved NLI. In an IPC model consisting of 60 minutes of ischemia and 3 hours of reperfusion, Adam *et al.*³³ also demonstrated a beneficial effect of IPC with elevated levels of hepatic glycogen compared to the group without IPC and concluded that the

levels of glycogen would be inversely related to ischemia duration. In a model of pharmacological IPC (minocycline) with 90 minutes of ischemia and up to 24 hours of reperfusion, Li *et al.*³⁴ showed a peak of enzymatic activity (AST, ALT, LDH) at 6 hours of reperfusion, marked histopathological changes from 6 hours of reperfusion, a progressive decline in these markers after 24 hours of evolution and a statistically significant cytoprotective effect in the group subjected to IPC. In our study, biochemical markers including bilirubin (DB and TB), transaminases (ALT and AST), alkaline phosphatase (AP), and GGT indicated significant organ lesions in the normothermic groups (NI and IPC) compared to those of the hypothermic groups (TH and IPC+TH) (Figures 2 and 3).

When analyzed separately, in this specific model, the mechanism of IPC was ineffective at promoting hepatic cytoprotection since the scores of animals subjected to IPC were similar to those of the NI group, through the histopathological assessment and the intraoperative biochemical and physiological effects. Similar findings were described by Steenks *et al.*³⁵ in an animal model comparing IPC with intermittent ischemia in steatotic livers, in which the authors described a smaller protective effect of IPC compared to that of intermittent or continued ischemia and argued that such findings might be explained by the negative effects of cytokines and other inflammatory molecules released by the ischemic lobe subjected to IPC onto the untreated lobes. Chu *et al.*³⁶, in a systematic review, described conflicting findings of some studies that evaluated the effect of IPC on steatotic livers submitted to LIR, suggesting that future experimental studies should attempt to better emulate the usual clinical scenario to provide an accurate understanding of the mechanisms and effects of IPC and identify a particular group of patients that can benefit from IPC. The scenario in which this method is most effective, likely does not include ischemia periods as long as the one used in this study. It must be also

highlighted that randomized studies in humans have failed to demonstrate these beneficial effects of IPC identified in experimental models^{37,38}.

The MHCS and the MSS, variants developed from the initial proposal of their authors, were used in this project to grade and compare the histopathological findings, permitting, with this expansion of its original indicators, especially those related to the division of necrotic areas in zones from the prior knowledge concerning the functional zoning of this organ, the obtaining of more accurate data in relation to the effects of the LIR and each protective mechanism tested, thus calculating a more comprehensive and more detailed injury score upon separate analysis of the different histological areas of necrosis. Originally, the table of Suzuki *et al.*²⁹ considered a single value for the item of necrosis and did not include the degree of S. There was no significant finding for NZ1 in all groups, but the findings for NZ2 and NZ3 in isolation are significant for group NI. The same significant finding alone in Group NI is repeated with the NLI item of the score. It is speculated that the lack of significance for the findings of NZ1 in this study was due to the proximity of this zone with the triad portal, a zone with greater tissue perfusion.

The complementary analyses of the intraoperative physiological parameters of different groups ($p > 0.05$) between the NIL samples of different groups ($p > 0.05$) and the paired analysis between the IL and NIL samples within each group ($p < 0.05$) using the MHCS and MSS scores, making each animal as a control of oneself and the others, highlight the methodological rigor employed since the different groups have similar intraoperative physiological parameters. They also show the effectiveness of the experimental model modified from the acute original model and used in this project. The modifications developed from the original technique of the LIR model²⁸, especially related to the anesthetic method, as already reported by Steenks *et al.*³⁵, in addition to the surgical incision and intra- and postoperative care, allowed for a viable extended LIR experimental model with 24 hours of evolution after severe original ischemic insult, thus

enabling the analysis of the effects of different methods of cytoprotection cited previously compared between themselves and jointly in this scientific project.

Conclusions

In this extreme scenario of LIR of this new model, evaluated with 24 hours of evolution after reperfusion, we concluded that only the groups submitted to intraoperative topical hypothermia demonstrated an expected hepatoprotective effect. This LIR model performs well and opens possibilities to test other tools to get better understanding and control of this important pathological process.

References

1. Abu-Amara M, Yang S, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks-A review. *Liver Transpl Surg.* 2010;16(9):1016-32. doi: 10.1002/lt.22117.
2. Bismuth H, Eshkenazy R, Arish A. Milestones in the Evolution of Hepatic Surgery. *Rambam Maimonides Med J.* 2011;2(1):1-11. doi: 10.5041/RMMJ.10021.
3. Jochmans I, Meurisse N, Neyrinck A, Verhaegen M, Monbaliu D, Pirenne J. Hepatic ischemia/reperfusion injury associates with acute kidney injury in liver transplantation: prospective cohort study. *Liver Transpl.* 2017;23(5):634-44. doi: 10.1002/lt.24728.
4. Prieto I, Monsalve M. ROS homeostasis, a key determinant in liver ischemic-preconditioning. *Redox Biol.* 2017;12:1020-5. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.036.
5. Quesnelle K, Bystrom P, Toledo-Pereyra L. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Arch Toxicol.* 2015;89(5):651-7. doi: 10.1007/s00204-014-1437-x.
6. van Riel W, van Golen R, Reiniers M, Heger M, van Gulik T. How much ischemia can the liver tolerate during resection? *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2016;5(1):58-71. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2015.07.05.
7. Patel R, Lang J, Smith A, Crawford J, J. Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Hepatol.* 2014;6(1):1-8. doi: 10.4254/wjh.v6.i1.1.
8. Cannistra M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, Naso A, Grande R, Serra R, Nardo B. Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg.* 2016;33 Suppl 1:57-70. doi: 10.1016/j.ijssu.2016.05.050.
9. Talebi Z, Peyvandi H, Dabbagh A. Cellular and molecular mechanisms in perioperative hepatic protection: a review of current interventions. *J Cell Mol Anesth.* 2017;2(2):82-93. doi: 10.22037/jcma.v2i2.14839.

10. Jaeschke H, Woolbright B. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012;26(2):103-14. doi: 10.1016/j.trre.2011.10.006.
11. Suyavaran A, Thirunavukkarasu C. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion-induced injury: update on molecular and future perspectives. *Hepatol Res*. 2017;47(1):31-48. doi: 10.1111/hepr.12706.
12. Abdo EE, Figueira ERR, Rocha-Filho JA, Chaib E, D'Albuquerque LAC, Bacchella T. Preliminary results of topical hepatic hypothermia in a model of liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Arq Gastroenterol*. 2017;54(3):246-9. doi: 10.1590/s0004-2803.201700000-30.
13. Khodosovsky MN. Effects of hypoxic preconditioning on the mechanisms of oxygen transport and oxidative damage during hepatic ischemia-reperfusion syndrome in rabbits. *Int J Phys Pathophys*. 2017;8(2):165-75. doi: 10.1615/IntJPhysPathophys.v8.i2.70.
14. Bystrom P, Foley N, Toledo-Pereyra L, Quesnelle K. Ischemic preconditioning modulates ROS to confer protection in liver ischemia and reperfusion. *EXCLI J*. 2017;16:483-96. doi: 10.17179/excli2017-166.
15. Song X, Zhang N, Xu H, Cao L, Zhang H. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *Int J Biol Sci*. 2012;8(5):707-18. doi: 10.7150/ijbs.4231.
16. Reyes-Gordillo K, Shah R, Muriel P. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Current and future therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-2. doi: 10.1155/2017/3140673.
17. Olthof PB, Reiniers MJ, Dirkes MC, Van Gulik TM, Heger M, Van Golen RF. Protective mechanisms of hypothermia in liver surgery and transplantation. *Mol Med*. 2015;21:833-46. doi: 10.2119/molmed.2015.00158.
18. Tapuria N, Junnarkar S, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR. Haemoxygenase modulates cytokine induced neutrophil chemoattractant in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7518-35. doi: 10.3748/wjg.v22.i33.7518.
19. Lentsch AB. Regulatory mechanisms of injury and repair after hepatic ischemia/reperfusion. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:1-14. doi: 10.6064/2012/513192.
20. Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol*. 2013;59(5):1094-106. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.017.
21. Alkozai E, Lisman T, Porte R, Nijsten M. Early elevated serum gamma glutamyl transpeptidase after liver transplantation is associated with better survival. *F1000Res*. 2014;3(85):1-11. doi: 10.12688/f1000research.3557.
22. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Krueel CD, Corso CO. Topical liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(4):262-6. doi: 10.1590/S0102-86502009000400004.
23. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, De Rossi SD, Corso CO. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26(3):194-201. doi: 10.1590/S0102-86502011000300007.
24. Longo L, Sinigaglia-Fratta LX, Weber GR, Janz-Moreira A, Kretzmann NA, Grezzana-Filho Tde J, Possa-Marroni N, Corso CO, Schmidt-Cerski CT, Reverbel-da-Silveira T, Alvares-da-Silva MR, dos-Santos JL. Hypothermia is better than ischemic preconditioning for preventing early hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Ann Hepatol*. 2016;15(1):110-20. doi: 10.5604/16652681.1184285.

25. McCafferty K, Forbes S, Thiernemann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech*. 2014;7(12):1321-33. doi: 10.1242/dmm.016741.
26. van Golen RF, Reiniers MJ, Heger M, Verheij J. Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models. *J Hepatol*. 2015;62(4):975-7. doi: 10.1016/j.jhep.2014.12.014.
27. Nadarajah L, Yaqoob MM, McCafferty K. Ischemic conditioning in solid organ transplantation: is it worth giving your right arm for? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(6):467-76. doi: 10.1097/mnh.0000000000000367.
28. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, Messmer K, Krombach F. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001;72(9):1486-90. doi: 10.1097/00007890-200111150-00003.
29. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-72. PMID: 7685932.
30. Colnot S, Perret C. Liver zonation. In: Monga SPS, editor. *Molecular pathology of liver diseases*. Boston, MA: Springer US; 2011. p.7-16. doi: 10.1007/978-1-4419-7107-4_2.
31. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999;30(6):1481-9. doi: 10.1002/hep.510300622.
32. Jin LM, Liu YX, Zhou L, Xie HY, Feng XW, Li H, Zheng SS. Ischemic preconditioning attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Pathobiology*. 2010;77(3):136-46. doi: 10.1159/000292647.
33. Adam AN. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med*. 2014;7:483-9. doi: 10.2147/IJGM.S66766.
34. Li Y, Li T, Qi H, Yuan F. Minocycline protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep*. 2015;3(1):19-24. doi: 10.3892/br.2014.381.
35. Steenks M, van Baal MC, Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Teo MH, Callahan T, Padbury RT, Barritt GJ. Intermittent ischaemia maintains function after ischaemia reperfusion in steatotic livers. *HPB (Oxford)*. 2010;12(4):250-61. doi: 10.1111/j.1477-2574.2010.00160.x.
36. Chu MJ, Vather R, Hickey AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Impact of ischaemic preconditioning on experimental steatotic livers following hepatic ischaemia-reperfusion injury: a systematic review. *HPB (Oxford)*. 2015;17(1):1-10. doi: 10.1111/hpb.12258.
37. O'Neill S, Leuschner S, McNally SJ, Garden OJ, Wigmore SJ, Harrison EM. Meta-analysis of ischaemic preconditioning for liver resections. *Br J Surg*. 2013;100(13):1689-700. doi: 10.1002/bjs.9277.
38. Selzner N, Boehnert M, Selzner M. Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012;26(2):115-24. doi: 10.1016/j.trre.2011.07.003.

Acknowledgements

All members of this research group, in addition to the personnel of the Animal Experimentation Unit of the HCPA, for their support during the study execution and data analysis.

Correspondence:

Gémerson Gabiatti
Rua Botafogo 1246/1002
90150-052 Porto Alegre – RS Brasil
gabiatti@yahoo.com

Received: June 07, 2018

Review: Aug 10, 2018

Accepted: Sept 09, 2018

Conflict of interest: none

Financial source: none

¹Research performed at Experimental Surgery Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Surgery. Tutor: Prof. Dr. Carlos Otávio Corso.

CERTIFICATE OF ENGLISH EDITING

This document certifies that the paper listed below has been edited to ensure that the language is clear and free of errors. The edit was performed by professional editors at Editage, a division of Cactus Communications. The intent of the author's message was not altered in any way during the editing process. The quality of the edit has been guaranteed, with the assumption that our suggested changes have been accepted and have not been further altered without the knowledge of our editors.

TITLE OF THE PAPER

**TOPICAL HEPATIC HYPOTHERMIA ASSOCIATED WITH ISCHEMIC
PRECONDITIONING: HISTOPATHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS
OF ISCHEMIA-REPERFUSION DAMAGE IN A 24 HOUR MODEL**

AUTHORS

**Gémerson Gabiatti, Carlos Bofill, Carlos Tadeu Schmidt Cerski, Stella Valle, Tomaz
Grezzana, Carlos Otávio Corso**

JOB CODE

GEGAB_1

Signature



Nikesh Gosalia,
Vice President, Author Services, Editage

Date of Issue

16 April 2018

Editage, a brand of Cactus Communications, offers professional English language editing and publication support services to authors engaged in over 500 areas of research. Through its community of experienced editors, which includes doctors, engineers, published scientists, and researchers with peer review experience, Editage has successfully helped authors get published in internationally reputed journals. Authors who work with Editage are guaranteed excellent language quality and timely delivery



Contact Editage

Worldwide
request@editage.com
+1 877-334-8243
www.editage.com

Japan
submissions@editage.com
+81 03-6868-3348
www.editage.jp

Korea
submit-korea@editage.com
1544-9241
www.editage.co.kr

China
fabiao@editage.cn
400-005-6055
www.editage.cn

Brazil
inquiry.brazil@editage.com
0800-892-20-97
www.editage.com.br

Taiwan
submitjobs@editage.com
02 2657 0306
www.editage.com.tw