

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

**APLICABILIDADE DE UM NOVO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO
DE DANO PRECOCE DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM FÍGADO DE RATOS**

CLEBER ROSITO PINTO KRUEL
ORIENTADOR: PROF. DR. CLEBER DARIO PINTO KRUEL

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2009

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

CLEBER ROSITO PINTO KRUEL

AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE E APLICABILIDADE DE UM NOVO
MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DE DANO PRECOCE DE
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM FÍGADO DE RATOS

ORIENTADOR: PROF. DR. CLEBER DARIO PINTO KRUEL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito obrigatório para obtenção do Título de Doutor em Medicina: Cirurgia

PORTO ALEGRE

2009

K644p **Kruel, Cleber Rosito Pinto**

Aplicabilidade de um novo modelo experimental para o estudo de dano precoce de isquemia e reperfusão em fígado de ratos / Cleber Rosito Pinto Kruel; orient. Cleber Dario Pinto Kruel. – 2009.

64 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. dano de isquemia/reperfusão, 2. novo modelo experimental 3. aplicabilidade 4. estresse oxidativo 5. Cirurgia I. Kruel, Cleber Dario Pinto II. Título.

NLM: WI 970

*À Carolina minha esposa e amada companheira que sempre me motivou a buscar constante
aperfeiçoamento.*

*Ao meu pai Cleber, pelo exemplo de empenho, dedicação e conduta tanto profissional como
familiar.*

*À minha mãe, Ines que com seu exemplo, sempre me motivou a buscar diferenciação
acadêmica.*

*Às minhas irmãs Juliana e Letícia por terem sido parceiras inestimáveis das minhas
conquistas.*

À minha filha Joana, pela alegria que trouxe ao nosso lar.

Faça as coisas o mais simples que você puder, porém não se restrinja às mais simples.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos colegas e parceiros fundamentais para o desenvolvimento e reprodução do modelo animal: Dra Raquel S. de Fraga, Dra Vera Camacho, Dra Siluê Dal Molin e ao Professor Mário Reis Álvares-da-Silva.

À Professora Roseli Möllercke (in memoriam) pelo seu apoio e incentivo no desenvolvimento do trabalho na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Eduardo Mottola e Marcos Duarte pela dedicação e auxílio no manuseio dos animais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Transplante hepático e o aproveitamento de órgãos com critérios expandidos	11
2.2 A lesão de isquemia/reperfusão e o estresse oxidativo.....	12
2.3 Modelos Experimentais	13
3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	19
4. OBJETIVOS.....	25
5. ARTIGO PUBLICADO NA TRANSPLANTATION PROCEEDINGS. VOLUME 39, ISSUE 10, DECEMBER 2007, PAGES 3015-3018.	27
6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	39
7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	51
8. ANEXOS.....	63
ANEXO 1: FOTO DA REPERFUSÃO HEPÁTICA	63
ANEXO 2: CIRURGIA PARA RETIRADA DO FÍGADO.....	64
ANEXO 3: ORGANOGRAMA DOS 4 EXPERIMENTOS ANALISADOS.....	65

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento constante de pacientes em lista de espera para transplante de fígado, há uma tendência mundial no sentido de se ampliar o número de doadores. Os modelos experimentais têm contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias que visam diminuir o dano de isquemia e reperfusão.

O objetivo deste estudo é avaliar a reprodutibilidade e aplicabilidade de um novo modelo experimental para estudar os efeitos precoces da reperfusão hepática (15 minutos). Métodos: No total foram obtidos para análise 42 experimentos provenientes de 4 estudos, que empregaram o novo modelo de reperfusão como ferramenta para avaliação de diferentes intervenções.

Nesta amostra foi analisada a reprodutibilidade do modelo através do número de perdas, e a sua aplicabilidade foi avaliada em relação ao potencial do mesmo para demonstrar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diversos parâmetros laboratoriais mensurados.

Resultados: Foi possível obter um período de reperfusão hepática de 15 minutos em 40 dos 42 animais estudados. O modelo foi capaz de demonstrar diferenças estatisticamente significativas em relação a diversos parâmetros relacionados à lesão tecidual secundária ao estresse oxidativo.

Conclusão: O novo modelo experimental é fácil de ser reproduzido e pode ser usado como uma opção para rastrear estratégias que minimizem o dano de isquemia e reperfusão.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Transplante hepático e o aproveitamento de órgãos com critérios expandidos

O transplante hepático é atualmente o tratamento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves do fígado. Os bons resultados garantiram que essa modalidade terapêutica ocupasse um papel fundamental oferecendo uma oportunidade única de aumento de sobrevida, além da melhoria da qualidade de vida de pacientes com doença hepática avançada e neoplasia primária do fígado (1, 2).

Apesar do aumento do número de transplantes hepáticos realizados no mundo, há um crescimento maior da lista de espera, e o principal fator a limitar o número de pacientes beneficiados com transplantes, com a possível exceção da Espanha, é a escassez de órgãos (3, 4).

É de conhecimento geral que quanto pior o doador, pior o enxerto, elevando-se as chances do mesmo ser danificado durante os procedimentos de retirada, preservação e implante (5). Em nosso meio, comparou-se a evolução inicial de pacientes transplantados hepáticos com enxertos de doadores não ideais (marginais), com aquela de pacientes que receberam órgãos de doadores ditos ótimos, corroborando esta impressão (6). No entanto, face à demanda crescente e à oferta limitada, o uso de fígados provenientes de doadores com critérios expandidos parece justificado (7, 8). A necessidade de aproveitamento de doadores não ótimos, passa pela distinção entre aqueles fígados que têm alta chance de apresentar disfunção, daqueles com baixa probabilidade de não funcionar adequadamente. Muitos são os fatores que interferem na função do enxerto, e entre eles estão a idade do doador, o grau de esteatose, o tempo de isquemia, o tempo de internação na unidade de terapia intensiva entre outros ainda não totalmente conhecidos (9). Essas condições acabam favorecendo a lesão

tecidual que ocorre em decorrência da privação de oxigênio, e que está presente em maior ou menor grau em todos os órgãos transplantados (10-12). O fenômeno nocivo secundário a este processo, recebe o nome de dano de preservação ou ainda dano de isquemia. No entanto, as agressões ao enxerto se manifestam clinicamente no momento em que o fluxo sanguíneo fica restabelecido. Nessa fase ocorre principalmente lesão endotelial com adesão e migração leucocitária, plaquetária, ativação de células de Kupffer e liberação de mediadores inflamatórios e radicais livres de oxigênio. Esses eventos geram grandes alterações endoteliais, e afetam diretamente o delicado balanço que mantém a homeostase da microcirculação dos órgãos transplantados (13). As características do doador e o tempo de isquemia apresentam íntima relação com a quantidade de dano tecidual, porém fatores relacionados ao momento da reperfusão também podem contribuir para o agravamento da lesão de isquemia/reperfusão (14, 15).

2.2 A lesão de isquemia/reperfusão e o estresse oxidativo

O controle do dano de isquemia/reperfusão é um dos principais fatores responsáveis pelo sucesso de transplantes de órgãos sólidos. Porém, os maiores avanços no processo de preservação de enxertos foram deduzidos de forma empírica nos últimos 40 anos, e ainda não estão totalmente compreendidos os mecanismos moleculares envolvidos nesse tipo de dano (16). A lesão tecidual costuma ocorrer de forma precoce durante a reperfusão, e a formação de radicais livres de oxigênio (RLO) exerce um papel decisivo que acaba resultando em morte celular. Assim sendo, uma melhor compreensão do dano tecidual, que ocorre na fase inicial da reperfusão, após a liberação de radicais livres de oxigênio (RLO), possibilitará que sejam adotadas novas estratégias (agentes farmacológicos) com o objetivo de minimizar lesão

e a modificação estrutural secundária, que ocorre com lipídios, proteínas e DNA e denomina-se estresse oxidativo (EO) (17).

Devido à necessidade de mensuração e quantificação do dano causado pelo processo de isquemia/reperfusão vários métodos têm sido publicados com o objetivo de identificar as intervenções benéficas. A dosagem de enzimas como as transaminases e a desidrogenase láctica (LDH), são as comumente empregadas, inclusive na prática clínica, e a elevação destas está relacionada com lesão celular e a não função do enxerto (18). Outros métodos também são freqüentemente utilizados por estudos experimentais com o objetivo de estimar a intensidade do estresse oxidativo, e realizam esta aferição de forma indireta através da dosagem das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), uma vez que os radicais livres de oxigênio são extremamente reativos e instáveis. A dosagem do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) tanto no tecido como também no soro, tem se mostrado útil na avaliação do dano principalmente em estudos experimentais. Outra forma de avaliação da capacidade de proteção de uma determinada intervenção farmacológica é feita através da mensuração de substâncias antioxidantes após a reperfusão (ex: dosagem de glutathione peroxidase). Todas estas ferramentas têm sido de grande valor para determinação do dano precoce causado pela isquemia/reperfusão, e os dados obtidos em estudos experimentais desempenham um importante papel na identificação de intervenções farmacológicas com capacidade de minimizar a injúria de reperfusão.

2.3 Modelos Experimentais

O processo de identificação de um agente farmacológico com propriedades que resultem em benefício clínico acaba sendo lento e dispendioso. Muitos estudos são necessários até que uma substância passe da fase de experimentação até o seu uso em seres

humanos. A descoberta de uma droga e o seu processo de desenvolvimento, passa necessariamente pela demonstração de seus efeitos farmacológicos por meio de estudos com cultura de células, e posteriormente por testes de eficácia e segurança em modelos com animais.

Existem cinco principais métodos para estudo do metabolismo hepático: hepatócitos isolados, cultura celular, lâminas de fígado, perfusão isolada e perfusão *in vivo* (19). Os modelos nos quais não é utilizada a reperfusão tecidual são mais fáceis de serem implantados e controlados, porém não reproduzem todo o cenário fisiológico que ocorre durante a reoxigenação tecidual. Diante deste contexto, é fundamental a utilização de modelos que mimetizam os efeitos da reperfusão hepática, uma vez que o sofrimento isquêmico do fígado ocorre de forma freqüente na medicina contemporânea, como nas ressecções hepáticas, no trauma e principalmente no transplante.

Entre os modelos de reperfusão *in vivo* se destaca a técnica em que o órgão sofre privação de oxigênio pelo clampeamento do pedículo vascular. Nestes experimentos há uma isquemia quente controlada que proporciona avaliação de diversas intervenções. No nosso país, há pesquisadores que utilizam essa técnica com sucesso (20-22), e inclusive em nosso meio ela é realizada com resfriamento do órgão *in situ* (23). Entretanto, o cenário clínico específico que ocorre com a preservação a frio do enxerto e a sua posterior reperfusão (transplante), não é reproduzido através deste tipo de desenho experimental.

A perfusão isolada do fígado com o uso de um sistema fechado possibilita reproduzir as condições encontradas no transplante. Após a perfusão do órgão com solução de preservação ocorre o resfriamento do mesmo, e a reperfusão tecidual é simulada através de um sistema controlado e fechado. Neste tipo de modelo há canulação das veias porta e cava e o fígado é perfundido com uma solução padrão de Krebs-Henseleit oxigenada e aquecida através de uma máquina que proporciona a recirculação desta solução em condições

controladas. Esta opção de colocar o fígado em uma plataforma de perfusão tem sido relatada desde meados do século XIX, quando Claude Bernard (1855) descreveu a conversão de glicogênio para glicose em fígados perfundidos com água potável. Diversas melhorias foram feitas ao longo dos anos e os modelos de perfusão isolada do fígado vêm se constituindo em um dos métodos mais utilizados para estudo do metabolismo e dano hepático. Em meados dos anos de 1950 na Universidade de Rochester, Miller e colaboradores desenvolveram um modelo de perfusão *ex situ* em sistema fechado e controlado, que contava com bombas para perfusão, cânulas e um aparato oxigenador (pulmão artificial). Esse modelo utilizava sangue para perfusão do fígado e foi muito importante para o conhecimento do metabolismo da insulina, glucagônio e cortisol. Um modelo alternativo de perfusão hepática em que não era necessária a utilização de derivados de sangue foi desenvolvido pela escola de Munique (Alemanha). Este modelo popularizou a solução de Krebs-Henseleit (solução tampão livre de hemoglobina), e possibilitou a perfusão *ex situ* de forma menos complexa, de tal maneira que vários pesquisadores vêm utilizando esse modelo experimental para estudar o metabolismo hepatobiliar de diferentes agentes farmacológicos (24-27).

Os modelos animais de transplante hepático são muito importantes porque se constituem em uma etapa de testes imediatamente anterior ao estudo em seres humanos. Isto ocorre porque o transplante proporciona a avaliação de aspectos relacionados à participação de células inflamatórias (leucócitos e células de Kupfer), anticorpos, plaquetas e citocinas nos eventos de isquemia e reperfusão. O restabelecimento do fluxo sanguíneo no tecido hepático costuma ser feito com técnica em posição ortotópica, mas a técnica heterotópica através da perfusão com sangue arterial (arterialização portal) também é utilizada com resultados fisiológicos satisfatórios (28-31). O efeito nocivo da rejeição hiperaguda (xenotransplantes) também tem sido estudado em modelos animais de transplante: suínos, cães e primatas (32, 33). Embora, animais de maior porte reproduzem condições mais

semelhantes às aquelas encontradas na prática clínica (34, 35), o menor custo e a sua praticidade acabam tornando o modelo em ratos o mais difundido entre as publicações científicas.

Quando comparamos os diferentes modelos experimentais utilizados no estudo de farmacocinética ou no potencial antioxidante de cada componente, notamos que existem vantagens e desvantagens de um modelo para o outro. Conforme ilustrado na tabela I, os modelos experimentais com hepatócitos são fáceis de reproduzir e poupam animais; no entanto, apresentam desvantagens em relação aos modelos com órgãos perfundidos, porque não são capazes de reproduzir os sistemas enzimáticos, a arquitetura lobular e a microcirculação. Em relação aos sistemas que utilizam órgãos, eles são os modelos que melhor representam o estado fisiológico, e entre eles certamente o transplante em pequenos animais é o modelo que apresenta maior destaque, porque mimetiza muitas das condições fisiológicas encontradas na prática clínica, além de possibilitar a avaliação da intervenção na sobrevivência dos animais a médio prazo (dias). No entanto, o domínio da técnica de transplante hepático em pequenos animais está restrita a alguns centros de excelência, sendo este modelo (transplante) considerado um dos procedimentos mais difíceis da cirurgia experimental (36-38).

A preservação a frio nos padrões atuais apresenta limitações em relação ao aproveitamento de enxertos com critério estendido. Uma das alternativas para recuperação e melhor utilização desse tipo de enxerto passa pela manipulação e intervenção farmacológica com substratos que tenham a capacidade de diminuir o dano de isquemia/reperfusão.

Nesse sentido, foi desenvolvido um modelo *in vivo* de reperfusão em ratos (39), no qual as novas intervenções farmacológicas são avaliadas após a preservação a frio do órgão, conservando algumas das vantagens relacionadas com modelos de reperfusão *in vivo*, como microcirculação intacta, arquitetura lobular, sistema enzimático preservado e representatividade do estado fisiológico. Além disso, neste modelo não existe a necessidade

de realizar microanastomoses em tempo reduzido, o que representa uma das principais dificuldades para reprodução e sistematização de um modelo experimental de transplante hepático em pequenos animais.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens entre modelos de reperfusão hepática isolada e outros modelos

	<i>Hepatócitos Isolados</i>	<i>Hepatócitos Cultura</i>	<i>Fígado Perfundido (ex situ)</i>	<i>In Vivo</i>
Arquitetura lobular	-	-	+	+
Microcirculação intacta	-	-	+	+
Sinais neuro-hormonais	-	-	-	+
Sistema enzimático preservado	+	-	+	++
Formação de bile	-	+/-	+	+
Viabilidade	Horas	Dias	Horas	Dias
Eficiência para coleta de dados	+++	+++	++	-
Flexibilidade do Modelo	++	++	+	-
Reprodutibilidade	+	+	+	+
Conveniência	+++	+++	++	+
Uso mínimo de animais	+	++	-	-
Representatividade do estado fisiológico	-	+/-	++	+++

Fonte: Brouwer, K.L. and R.G. Thurman, Isolated perfused liver. Pharm Biotechnol, 1996(19).

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Campos BD, Botha JF. Transplantation for hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009 Apr;7(4):409-17.
2. Desai R, Jamieson NV, Gimson AE, Watson CJ, Gibbs P, Bradley JA, et al. Quality of life up to 30 years following liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008 Oct;14(10):1473-9.
3. Norman DJ. Allocation of livers for liver transplantation: ethics and politics. *Clin Liver Dis*. 1997 Aug;1(2):281-6, viii.
4. Melendez HV, Heaton ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation*. 1999 Aug 27;68(4):469-71.
5. De Carlis L, Sansalone CV, Rondinara GF, Colella G, Slim AO, Rossetti O, et al. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int*. 1996;9 Suppl 1:S414-7.
6. Grezzana TJ, Corso CO, Zanutelli ML, Marroni CA, Brandao AB, Schlindwein E, et al. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplant Proc*. 2004 May;36(4):843-5.
7. Rosen HR, Madden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology*. 1999 Feb;29(2):365-70.
8. Mueller AR, Platz KP, Krause P, Steinmuller T, Glanemann M, Neumann U, et al. Is the use of marginal liver grafts justified? *Transplant Proc*. 1999 Feb-Mar;31(1-2):401-2.
9. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008 Dec;14(12):1694-707.

10. Gaffey MJ, Boyd JC, Traweek ST, Ali MA, Rezeig M, Caldwell SH, et al. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1997 Jan;25(1):184-9.
11. Wang L, Florman S, Roayaie S, Basile J, Zhang ZY, Machac J, et al. Differential in vivo recovery of sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. *Transplantation*. 1998 Sep 15;66(5):573-8.
12. Cohen AJ, Burczynski FJ, Rosser BG, Lipschitz J, Minuk GY. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation. *Am J Surg*. 2000 Feb;179(2):154-60.
13. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol*. 2003 Apr;74(2):86-93.
14. Belghiti J, Noun R, Sauvanet A, Durand F, Aschehoug J, Erlinger S, et al. Transplantation for fulminant and subfulminant hepatic failure with preservation of portal and caval flow. *Br J Surg*. 1995 Jul;82(7):986-9.
15. Heidenhain C, Heise M, Jonas S, Ben-Asseur M, Puhl G, Mittler J, et al. Retrograde reperfusion via vena cava lowers the risk of initial nonfunction but increases the risk of ischemic-type biliary lesions in liver transplantation--a randomized clinical trial. *Transpl Int*. 2006 Sep;19(9):738-48.
16. Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD, et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet*. 1988 Mar 19;1(8586):617-9.
17. Busquets J, Serrano T, Figueras J, Ramos E, Torras J, Rafecas A, et al. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc*. 2002 Feb;34(1):252-3.

18. Rosen HR, Martin P, Goss J, Donovan J, Melinek J, Rudich S, et al. Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation. *Transplantation*. 1998 Jan 15;65(1):68-72.
19. Brouwer KL, Thurman RG. Isolated perfused liver. *Pharm Biotechnol*. 1996;8:161-92.
20. Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, Eduardo-Figueira M, Pinto R, Chaud M, et al. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *Br J Nutr*. 2009 Jul;102(1):126-33.
21. Taha MO, Simoes MJ, Nogueroles EC, Mendonca FP, Pascoalick HM, Alves RA, et al. Effects of allopurinol on ischemia and reperfusion in rabbit livers. *Transplant Proc*. 2009 Apr;41(3):820-3.
22. 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 Jan-Feb;24(1):52-6.
23. Grezzana Filho Tde J, Mendonca TB, Gabiatti G, Kruel CD, Corso CO. Topic liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2009 Jul-Aug;24(4):262-6.
24. Smrekova R, Vajdova K, Kukan M, Ulicna O, Lutterova M, Wsolova L, et al. A rapid, simple, and cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat. *Transplantation*. 2000 Aug 15;70(3):430-6.
25. Schuster H, Blanc MC, Bonnefont-Rousselot D, Nakib S, Le Tourneau A, Furst P, et al. Protective effects of glutamine dipeptide and alpha-tocopherol against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat liver. *Clin Nutr*. 2009 Jun;28(3):331-7.
26. Pevni D, Frolkis I, Schwartz D, Schwartz I, Chernichovski T, Kramer A, et al. New evidence for the role of TNF-alpha in liver ischaemic/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest*. 2008 Sep;38(9):649-55.

27. Lutterova M, Kukan M, Vajdova K, Kuba D, Mislanova C, Kebis A, et al. Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbecks Arch Surg.* 2001 Feb;386(1):31-7.
28. Schleimer K, Stippel DL, Tawadros S, Holzen J, Holscher AH, Beckurts KT. Improved technique of heterotopic auxiliary rat liver transplantation with portal vein arterialization. *Langenbecks Arch Surg.* 2006 Apr;391(2):102-7.
29. Muller V, Ott R, Tannapfel A, Hohenberger W, Reck T. Arterialization of the portal vein in liver transplantation: a new microsurgical model in the rat. *Transplantation.* 2001 Apr 15;71(7):977-81.
30. Muller V, Brummer D, Erhardt W, Henke J, Kissler H, Bauer M, et al. Arterialisation of the portal vein as a model for the induction of hepatic fibrosis: description of microsurgical models in the rat. *Transpl Int.* 2005 May;17(12):822-33.
31. Fernandez-Rodriguez OM, Rios A, Montoya M, Ramirez P, Gonzalez F, Ruiz de Angulo D, et al. Description of a new auxiliary heterotopic partial liver transplantation technique with portal vein arteriolization of applicability in heterotopic liver xenotransplantation. *Transplant Proc.* 2003 Aug;35(5):2051-3.
32. Palenciano CG, Acosta F, Segura B, Sansano T, Ramirez P, Fernandez-Rodriguez O, et al. Hemodynamic changes during reperfusion of the graft in an animal model of liver xenotransplantation. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2441-2.
33. Chung KY, Park JJ, Han KH. Pig to canine auxiliary hepatic xenotransplantation model: prevention of hyperacute rejection via Kupffer cell blockade and complement regulation. *Transplant Proc.* 2008 Oct;40(8):2755-9.
34. Oike F, Uryuhara K, Otsuka M, Dehoux JP, Otte JB, Lerut J, et al. Simplified technique of orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplantation.* 2001 Jan 27;71(2):328-31.

35. Torres OJ, Pantoja PB, Barbosa ES, Barros Cde A, Servin ET, Servin SC. Hemodynamic alterations during orthotopic liver experimental transplantation in pigs. *Acta Cir Bras.* 2008 Mar-Apr;23(2):135-9.
36. Holzen JP, Palmes D, Langer M, Spiegel HU. Microsurgical training curriculum for learning kidney and liver transplantation in the rat. *Microsurgery.* 2005;25(8):614-23.
37. Matevossian E, Doll D, Huser N, Brauer R, Sinicina I, Nahrig J, et al. Liver transplantation in the rat: single-center experience with technique, long-term survival, and functional and histologic findings. *Transplant Proc.* 2009 Jul-Aug;41(6):2631-6.
38. Lausada NR, Gondolesi GE, Ortiz E, Dreizzen E, Raimondi JC. [Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment]. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2002;32(2):63-70.
39. Pinto Krueh 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. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):3015-8.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

- Avaliar a aplicabilidade de um modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática em fígado de ratos.

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO
TRANSPLANTATION PROCEEDINGS

5. ARTIGO PUBLICADO NA TRANSPLANTATION PROCEEDINGS. VOLUME 39, ISSUE 10, DECEMBER 2007, PAGES 3015-3018.

Hepatic Reperfusion in Rats: A New Model With Portal Arterialization in Studying Early Ischemia-Reperfusion Injury

C.R. Pinto Kruef^a, R. Scherer de Fraga^a, S. Dal Molin^a, S.M. Mota^a, G. Gasperin^a, C.T.S. Cerski^a, J.R. de Oliveira^a and M.R. Álvares-da-Silva^a

Supported in part by grants from Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and Ministry of Education (CAPES Foundation) Brazil.

^aDivision of Gastroenterology, Post-Graduate Program in Gastroenterology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil; and the Biophysical Laboratory, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

Available online 21 December 2007.

Abstract

Isolated liver perfusion has been used to evaluate the beneficial effects of several agents. In the present study, we developed a model using a recipient rat to reperfuse harvested livers in an ex situ, in vivo recirculating system. A total of 25 reperfusion procedures using adult male Wistar rats as donors and recipients were done. The preservation of the livers was performed with University of Wisconsin solution for 6 hours. Thereafter, the liver was reperfused with blood from another rat. We believe that the model presented herein offers an alternative method to evaluate early hepatocellular damage or hepatic microcirculation.

Introduction

There are five commonly used methods to study hepatic metabolism: isolated hepatocytes, cell culture, liver slices, perfused or in vivo liver.¹ Models without a reperfusion system are easier to perform and control, but they do not reproduce the physiological scenario of liver reoxygenation.

Regarding the ischemia-reperfusion (I/R) process, one of the earliest and most important features related to tissue damage is the production of reactive oxygen species (ROS).² New therapeutic strategies might be focused on ROS-induced early lesions to decrease graft injury. Experimental models involving liver reperfusion are still an important tool in this process.

At present, isolated liver perfusion has been used to evaluate the beneficial effects of several agents. This model uses Krebs-Henseleit bicarbonate buffer with or without blood to simulate reperfusion in a closed circuit system with pumps. This reperfusion method simulates the in vivo environment with the advantage of precisely controlling experimental conditions.¹ However, it shows some limitations, such as the absence of whole blood components and hormones.

Liver transplantation in animals has also been used by many researchers to study hepatic damage after reperfusion stress. Although animal transplantation creates almost the same conditions faced in clinical practice, it is one of the most difficult models in experimental surgery.³ In the present study, we developed a model to study early I/R injury, through oxidative stress, using a recipient to for perfuse harvested livers in an ex situ and in vivo recirculating system, seeking to simulate a liver transplantation procedure.

Materials and Methods

Adult male Wistar rats underwent 25 reperfusion procedures, including the same number of liver procurements. The first 10 were considered a pilot study to develop the model. At this no specimens were collected for biochemical or histological analysis.

Animals

Rats weighing 300 to 450 g were used as donors and recipients. The animals were housed at 22°C controlled temperature with light and dark cycles and fed rat chow and water ad libitum. All experiments were performed according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (revised 1985). The protocol was approved by the local Ethics Committee (Ethical Committee of UEA/HCPA/UFRGS) and fulfilled all local regulations for research involving experimental animals.

Procedures

All procedures were performed on a warmed surgical table to keep the animal at a proper temperature. The animals were submitted to inhalation anesthesia with a calibrated vaporizer mixture of oxygen and isoflurane 1.5% (Isoflurano, Abbott) through a face mask. After shaving and disinfecting the abdominal wall with povidine iodine, it was opened by a midline incision with bilateral subcostal extensions.

The bile duct was cannulated with N22 (Abbocath), and 250 IU of heparin was injected through the infrahepatic vena cava. The infrarenal aorta was cannulated with an N4 catheter. The portal vein was also cannulated with an N6 catheter. After vascular cannulation, supradiaphragmatic aorta was cross-clamped to start retrograde perfusion. University of

Wisconsin (UW) solution (Viaspan, Bristol-Myers-Squibb) at 4°C (125 mL) was infused through the portal vein and the aorta at a constant perfusion pressure of 60 cm H₂O. The suprahepatic vena cava was transected close to the diaphragm, allowing outflow of the perfusate. During perfusion, the abdominal cavity was cooled with normal saline ice. At the end of perfusion, livers harvested with a catheter inserted into the portal vein were placed into a plastic bag containing 80 mL of cold UW solution. The organs were stored at 4°C for 6 hours.

After cold storage, livers were taken to room temperature (22°C) to increase warm ischemia time. The superior vena cava was cannulated with an N6 tube and the inferior vena cava was closed with a 4.0 silk tie. The organs were flushed with 5 mL of normal saline (0.9%) to wash out UW solution. Another N4 catheter was connected to the portal vein catheter to avoid vessel-catheter diameter mismatch during aorta cannulation in the recipient rat. After a period of 15 minutes at room temperature, the liver was placed on in a small table at the left side of the operating table. This table was 10 cm higher than the operating field, a difference adopted to facilitate venous outflow through the recipient rat.

At the same time, another rat was anesthetized with a mixture of oxygen and isoflurane (1.5%), and the abdomen incised caudocranially. The inferior vena cava and infrarenal aorta were encircled by a 4.0 silk, and tributaries ligated to increase vessel length for cannulation. Heparin (250 IU) was intravenously injected, and later, the distal portions of the inferior vena cava and aorta were ligated to exclude lower limb circulation. A clamp was placed just above left renal vein taking vena cava and aorta, which was cannulated using a 25-cm-long catheter connected to the portal vein of the excised liver. The inferior vena cava cannulated by an N6 catheter was also connected to the explant superior vena cava to create a closed circuit system ([Fig 1](#)).

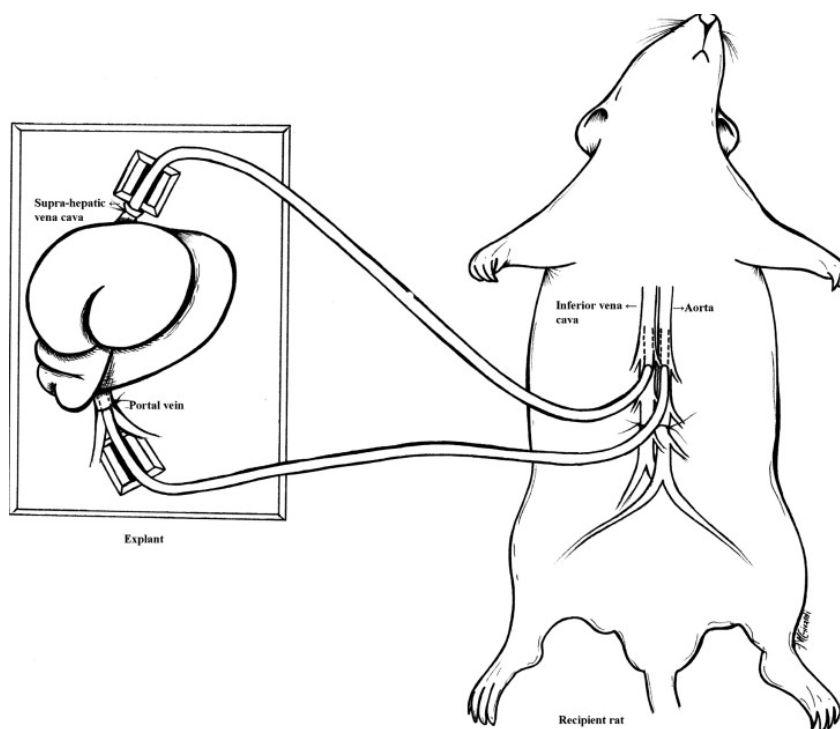


Fig 1. The reperfusion model.

Reperfusion was initiated by releasing the clamp. Fluid replacement with 3 to 5 mL of saline solution intravenously was performed to maintain the blood pressure. After 15 minutes of arterial reperfusion, the system was interrupted, and samples from the suprahepatic vena cava of the reperfused liver were taken for kinetic measurements of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and lactate dehydrogenase (LDH; a Liquiform kit). At this point, the animals were sacrificed by exsanguination, during anesthesia. The reperfused liver tissue was flushed with 10 mL of saline solution and liver fragments processed for histological examination.

Histological Analysis

Liver biopsies fixed in 10% buffered formalin were embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin.

Statistics

Statistics were performed using SPSS 10.0 for Windows. The mean scores were calculated with results expressed as mean values \pm standard deviations.

Results

During the first phase—the pilot study—the liver was kept under ex situ reperfusion for a longer period than possible until the death of the animal due to circulatory shock. Two rats died just after clamp release, and another three rats died between 7 and 10 minutes of reperfusion. Average reperfusion time was 14.9 (\pm 11.9) min, so that 15 minutes was used for the second phase of the study. However, it was remarkable that with increasing experience, it was also possible to increase the reperfusion time. Considering just the last five experiments, the average reperfusion time was 22.9 (\pm 11.2) min ([Table 1](#)).

Table 1. Reperfusion Time Obtained in the Pilot Study Experiments

Procedures in Sequence of Events	Reperfusion Time (min)
1	1.5
2	1.8
3	14.5
4	7.3
5	9.1
6	8.2
7	13.5
8	31
9	30
10	32

In the second phase, there were no animal losses during the reperfusion. Body weight was 400.4 (± 39.5) g. Average serum levels of AST, ALT, and LDH were 162.2 (± 128.3) UI/L, 150.6 (± 102.2) UI/L, and 1161.6 (± 1053.9) UI/L, respectively. Warm ischemia time was 56.6 (± 10) minutes.

In 60% of the livers, slight hepatocyte vacuolization ($n = 9$) was seen, and macrovesicular steatosis was seen in 40%. Sinusoidal congestion and signs of preservation injury were not detected ([Fig 2](#)).

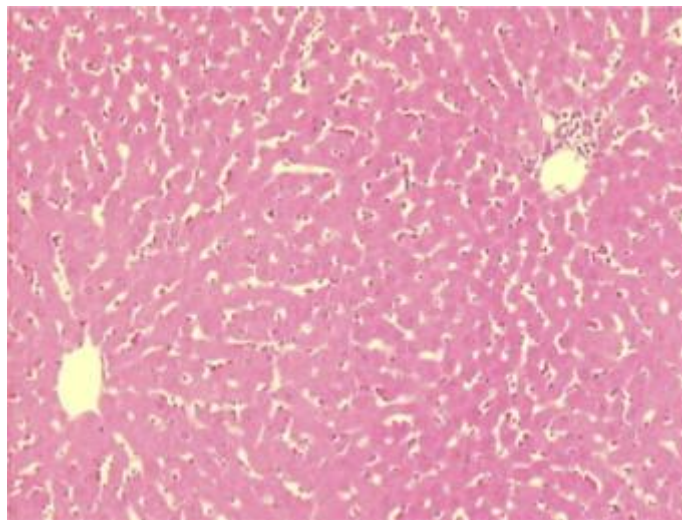


Fig 2. Normal hepatic architecture, without signs of preservation injury (hematoxylin-eosin, 200 \times).

Discussion

Experimental models play an important role to develop new strategies. Both early and late effects of reperfusion can be evaluated in transplanted animals,⁴ and ⁵ especially larger animals such as pigs, but they are time-consuming and expensive. The orthotopic rat liver transplant model is a widely used technique in transplantation research. It has many

advantages over other animal transplant models, because of its availability and low cost, but requires thorough training.

We developed an original model of liver reperfusion in rats. First, this model involved cold storage, warm ischemia, and reperfusion, simulating a liver transplantation. Therefore, it was distinct from other I/R models, which usually are made with just normothermic reperfusion.

Portal blood is important for the liver, and in liver transplantation the portal vein is the usual way to reperfuse the organ. Our initial idea was to use the portal vein flow to reperfuse the liver graft. Using this technique, venous outflow was insufficient to maintain liver blood supply. Then, we decided to arterialize portal vein flow. This technique has been used in rat transplant models without prejudice to the graft.^{6 and 7} One may consider that arterial flow could damage the hepatic microcirculation. As I/R injury is directly related to oxidative stress, reperfusion with more oxygenated arterial blood could increase the lesion.

Most published studies have evaluated hepatocellular injury after 30 minutes of the reperfusion.^{8, 9 and 10} Despite the limited observation time of our study, recent publications have demonstrated that early markers could estimate graft damage in an early phase of reperfusion¹¹ or even in the washout solution after hepatic rinsing.¹²

Due to the short time of the reperfusion, it was not expected to find classic histological changes of ischemic injury, preventing the use of international standards to describe the pathological findings of liver ischemia. In the present study, liver histology showed adequate organ viability without signs of endothelial damage or of preservation injury.

Our group is using this model of reperfusion in comparative studies with different preservation solution for measurement of hepatic enzymes, as well as evaluation of oxidative stress, of cytokine formation, and of intercellular adhesion molecule expression.

Considering the results, we believe that the model presented herein is an alternative to evaluate early hepatocellular damage and microcirculation.

References

- [1](#) K.L. Brouwer and R.G. Thurman, *Pharmaceutical Biotechnology* **8** (1996), p. 161.
- [2](#) C. Fondevila, R.W. Busuttil and J.W. Kupiec-Weglinski, *Exp Mol Pathol* **74** (2003), p. 86. |
- [3](#) J.P. Holzen, D. Palmes and M. Langer *et al.*, *Microsurgery* **25** (2005), p. 614.
- [4](#) T.H.J. Mueller, K. Kienle and A. Beham *et al.*, *Transplantation* **78** (2004), p. 1267.
- [5](#) V. Müller, D. Brummer and W. Erhardt *et al.*, *Transpl Int* **17** (2005), p. 822.
- [6](#) K. Schleimer, D.L. Stippel and H.U. Kasper *et al.*, *J Surg Res* **116** (2004), p. 202.
- [7](#) V. Müller, D. Brummer and H. Kissler *et al.*, *Transplantation* **78** (2004), p. 1159.
- [8](#) S. Nagel, O. Hegemann and D.A. Groneberg *et al.*, *Toxicol Pathol* **33** (2005), p. 434
- [9](#) G. Nowak, U.G. Norén and A. Wernerson *et al.*, *Transpl Int* **17** (2005), p. 804.
- [10](#) I. Arnault, Y.M. Bao and M. Sebah *et al.*, *Transplantation* **76** (2003), p. 77.
- [11](#) D. Monbaliu, B. de Vries and T. Crabbé *et al.*, *Transplan Proc* **37** (2005), p. 413
- [12](#) R. Smrekova, K. Vajdova and M. Kukan *et al.*, *Transplantation* **70** (2000), p. 430

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Reprodutibilidade de um modelo experimental para estudo do dano precoce de isquemia e reperfusão em fígado de ratos

Cleber Rosito Pinto Krueel, Raquel Scherer de Fraga, Vera Camacho, Siluê Dal Molin, Mario Reis Álvares-da-Silva, Cleber Dario Pinto Krueel

Estudo realizado na unidade de experimentação animal, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Resumo

Devido ao aumento constante de pacientes em lista de espera para transplante de fígado, há uma tendência mundial no sentido de se ampliar o número de doadores. Os modelos experimentais têm contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias que visam diminuir o dano de isquemia e reperfusão. O objetivo deste estudo é avaliar a aplicabilidade de um novo modelo experimental para estudar os efeitos precoces da reperfusão hepática (15 minutos). Métodos: No total foram obtidos para análise 42 experimentos provenientes de 4 estudos, que empregaram o novo modelo de reperfusão como ferramenta para avaliação de diferentes intervenções. A aplicabilidade foi avaliada em relação ao potencial do mesmo para demonstrar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diversos parâmetros laboratoriais mensurados. Resultados: Foi possível obter um período de reperfusão hepática de 15 minutos em 40 dos 42 animais estudados. O modelo foi capaz de demonstrar diferenças estatisticamente significativas em relação a diversos parâmetros relacionados à lesão tecidual decorrente de estresse oxidativo. Conclusão: O novo modelo experimental é fácil de ser reproduzido e pode ser usado como uma opção para rastrear estratégias que minimizem o dano de isquemia e reperfusão.

Unitermos: dano de isquemia/reperfusão, aplicabilidade, novo modelo experimental, estresse oxidativo

Introdução

Estudos com perfusão hepática têm sido utilizados desde o século 19, quando Claude Bernard descreveu pela primeira vez a conversão de glicogênio em glicose no fígado perfundido com água potável (1). Várias melhorias nos equipamentos e técnica têm sido feitos nos últimos 60 anos, a partir da introdução de circuitos isolados contendo o sangue oxigenado para perfundir o fígado. Estes modelos foram decisivos para uma melhor compreensão do metabolismo de hormônios importantes como a insulina, glucagon e cortisol (1). Atualmente, existem vários modelos que foram usados para estudar não só o metabolismo hepático, mas também os danos causados pelo processo de isquemia/reperfusão, e também os processos envolvidos na rejeição hiperaguda no contexto do xenotransplante (2-5). A gravidade da lesão de isquemia/ reperfusão é um dos principais problemas responsável pela disfunção e não função do enxerto (6). Diante deste contexto, a pesquisa experimental pode auxiliar na otimização e preservação de órgãos, se constituindo em um campo de pesquisa promissor para expandir o número de doadores no cenário atual de escassez de órgãos.

O processo de escolha de um modelo experimental deve levar em consideração suas vantagens e desvantagens. O estudo deve ser delineado com base no modelo que apresenta maior probabilidade de produzir informações adequadas para testar uma determinada hipótese. Hepatócitos isolados e cultura de células são métodos que poupam animais e recursos, além de serem convenientes, mas não são adequados para o estudo da arquitetura e da microcirculação hepática (1). O modelo no qual o fígado é perfundido em circuito fechado favorece a reprodução da maioria das condições fisiológicas. Muitos autores têm utilizado esse sistema para o estudo da isquemia/reperfusão, mas a ausência de células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias podem modificar a resposta inflamatória e o dano tecidual que ocorre após a reoxigenação. Os transplantes hepáticos em animais são modelos *in vivo* que

melhor simulam as condições clínicas. No entanto, o transplante de fígado, em animais de pequeno porte, é um dos procedimentos mais desafiantes da cirurgia experimental, o que limita em parte sua reprodutibilidade (7-9).

As condições acima mencionadas justificam a necessidade de se estabelecer uma alternativa de modelo *in vivo* que seja mais acessível que o transplante em pequenos animais, para que possam ser realizados mais estudos em isquemia/reperfusão. Diante deste contexto, foi publicado recentemente a nossa experiência inicial com um modelo experimental *in vivo* que utilizou a arterialização portal para estudar o dano precoce de reperfusão (10). O objetivo deste estudo é analisar o modelo experimental desenvolvido em nossa instituição, em quatro diferentes estudos realizados pelo mesmo grupo, para determinar a sua utilidade e a sua reprodutibilidade.

Métodos

No presente estudo analisamos a aplicabilidade do nosso modelo experimental desenvolvido para a avaliação precoce da injúria de isquemia / reperfusão em fígado de ratos. O tamanho da amostra utilizada para a análise continha um total de 42 procedimentos de reperfusão hepática que foram realizados em nossa instituição, provenientes de quatro diferentes estudos (duas dissertações de mestrado e duas teses de doutorado) (16-19). Todos os procedimentos de reperfusão foram conduzidos com os mesmos aspectos metodológicos no modelo original publicado (10). O comitê de ética e pesquisa da instituição aprovou todos os estudos que aplicaram o modelo animal em questão.

Análise da Aplicabilidade

Vários parâmetros foram utilizados para avaliar a aplicabilidade deste modelo. Os dados (médias) obtidos a partir das amostras no final da reperfusão, foram considerados úteis quando os valores eram estatisticamente significativos entre os grupos. A lesão hepatocelular foi avaliada pela dosagem da atividade enzimática da AST, ALT e LDH no soro proveniente do efluente hepático. Os valores foram expressos em UI / L. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada de forma indireta, através da aferição da concentração de TBARS no soro e no tecido hepático. Ambos os valores foram expressos em nmol / ml. A concentração de glutathiona peroxidase foi medida no tecido hepático para avaliar a capacidade antioxidante. Renina foi avaliada como um potencial marcador de fibrogênese a partir de sua dosagem sérica (efluente) em 25 casos. Todas as amostras foram fixadas em formalina (10%) e incluídas em parafina para posterior coloração com hematoxilina-eosina. Análise imunohistoquímica do tecido foi feita com marcadores para TGF B1 e receptor AT1 de angiotensinogênio nos últimos experimentos (25 amostras).

Estatística

As médias obtidas em cada grupo foram analisadas para avaliar significância estatística por análise de variância (ANOVA) e testes de múltiplas comparações (Student-Neuman-Keuls). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Aplicabilidade

O modelo foi reproduzido com sucesso em 40 dos 42 experimentos, o que representa menos de 5% de perdas. Estes procedimentos forneceram 40 amostras de fígado que foram avaliadas em 4 estudos diferentes. Os parâmetros laboratoriais foram avaliados após 15 minutos de reperfusão, e alguns deles mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Tabela 1). Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na concentração de TBARS obtida a partir do soro, em estudo que comparou o uso de dois anestésicos inalatórios (sevoflurano Vs isoflurano). Valores bioquímicos de AST, ALT e LDH foram capazes de identificar mais lesão celular em uma solução contendo Frutose 1-6 bisfosfato quando comparada com solução de UW. A avaliação do efeito da N-acetil-L-cisteína isolada e em combinação com solução de UW demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação níveis séricos de renina no soro do efluente hepático. A concentração de glutathione peroxidase foi maior no tecido hepático dos órgãos preservados com solução de UW versus N-acetil-L-cisteína. As análises imunohistoquímica e histológica não foram úteis para comparar intervenções neste desenho experimental.

Tabela 1- Parâmetros laboratoriais avaliados em 40 amostras divididas em grupos de cinco

Método	Diferença estatisticamente significativa (p<0.05)
TGO, TGP e LDH- soro do efluente	Menor valor no UW Vs soluções com Frutose e N-acetil-L-cisteína
TBARS – soro do efluente	Níveis mais elevados no grupo de Isoflurano Vs Sevoflurano
Renina – soro do efluente	Menor nas soluções com N-acetyl-L-cysteine Vs solução de UW
Glutathiona-tecido hepático	Mais elevada na solução UW Vs soluções com N-acetyl-L-cysteine
Imunohistoquímica (TGF β 1 e receptor para AT)	Negativos para todas as amostras

TGO: Transaminase glutâmico pirúvica; TGP:Transaminase glutâmico oxalacética;LDH:Lactato desidrogenase;TGF β 1:Fator transformador de crescimento beta;Receptor AT: receptor de Angiotensona II tipo A;UW :solução da Universidade de Wisconsin.

Discussão

Devido à escassez de órgãos, há uma tendência de expansão dos critérios para aceitação de doadores. Conseqüentemente, enxertos com uma maior probabilidade de apresentarem disfunção primária ou mesmo não função têm sido utilizados com mais freqüência em todo o mundo (11). Porém, o conceito atual de qualidade de enxerto está relacionado a uma faixa contínua de risco, e não a uma classificação dualista do tipo bom ou ruim. Diante deste contexto, os estudos experimentais são o cenário ideal para o teste de novas drogas ou intervenções que tenham como objetivo diminuir o dano de isquemia/reperfusão (12). Assim sendo, um modelo de fácil reprodutibilidade pode ser usado com uma ferramenta útil para estudar intervenções protetoras.

Uma questão importante relativa a um novo modelo experimental é a sua capacidade de ser reproduzido. O transplante hepático em pequenos animais é considerado um dos procedimentos mais importantes no desenvolvimento e estudo de novos fármacos. No entanto, este delicado procedimento é realizado em poucos centros especializados no mundo, porque requer treinamento específico em microcirurgia. O modelo desenvolvido na nossa instituição foi capaz de reperfundir fígados de ratos, porém não existia uma certeza em relação sua reprodutibilidade. Após o desenvolvimento do modelo experimental, foram realizados 42 procedimentos de reperfusão em 4 diferentes estudos, que tinham o intuito de avaliar estresse oxidativo e lesão hepática em órgãos preservados a frio e expostos a diferentes intervenções. Como esperado, as perdas nesta fase foram mínimas (menos de 5%), indicando que este procedimento de reperfusão pode ser reproduzido por outros pesquisadores com uma curva de aprendizado pequena.

O estresse oxidativo e lesão celular são eventos precoces da reperfusão hepática resultando em alterações bioquímicas e nos tecidos, que são perceptíveis, logo após a reoxigenação (os primeiros 30 a 120 minutos). No modelo desenvolvido por nosso grupo, conseguimos atingir 15 minutos de reperfusão, porém poucos estudos avaliaram os danos de isquemia e reperfusão em uma fase extremamente precoce (13, 14). No entanto, quando analisamos os testes bioquímicos (AST, ALT e LDH) obtidos a partir de nosso modelo, notamos que o modelo foi capaz de identificar que a solução de UW era superior as demais em relação à prevenção do dano hepatocelular. A mensuração de TBARS no soro do efluente, foi útil para detectar diferenças na capacidade antioxidante, bem como os níveis de glutathione aferida em tecido hepático. Embora, um longo período de reperfusão seja mais adequado para detectar lesões relacionadas à preservação hepática, o modelo em questão foi capaz de demonstrar que pelo menos alguns dos testes podem ser usados para identificar diferenças entre as intervenções.

O tempo no qual o fígado permanece em perfusão é uma limitação que existe no nosso modelo. Normalmente o estresse oxidativo é avaliado após um período maior de tempo, embora alguns autores tenham demonstrado que existem marcadores super precoces de lesão de isquemia e reperfusão (13-14). O motivo pelo qual a reperfusão não foi mantida por mais tempo no nosso modelo, foi provavelmente devido à hipovolemia (15). Assim sendo, acreditamos que com a introdução da monitorização hemodinâmica dos animais e redução da massa hepática perfundida, se possa prolongar o tempo do experimento.

O modelo de isquemia/reperfusão desenvolvido em nossa instituição foi capaz de discriminar diferenças estatisticamente significativas nas concentrações séricas de substâncias relacionadas com disfunção hepática e fibrogênese (TBARS e renina respectivamente), bem como identificar tratamentos com menor capacidade antioxidativa (dosagem de glutathione). Considerando a viabilidade e aplicabilidade do modelo, acreditamos que após a incorporação de algumas melhorias, ele possa se constituir em uma boa alternativa para o estudo de potenciais intervenções terapêuticas que visem minimizar a lesão do enxerto.

Referências

1. Brouwer KL, Thurman RG. Isolated perfused liver. *Pharm Biotechnol.* 1996;8:161-92.
2. Smrekova R, Vajdova K, Kukan M, Ulicna O, Lutterova M, Wsolova L, et al. A rapid, simple, and cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat. *Transplantation.* 2000 Aug 15;70(3):430-6.
3. Nagel S, Hegemann O, Groneberg DA, Grosse-Siestrup C. An improved model of isolated hemoperfused porcine livers using pneumatically driven pulsating blood pumps. *Toxicol Pathol.* 2005;33(4):434-40.
4. Fernandez-Rodriguez OM, Palenciano CG, Rios A, Martinez L, Arance M, Segura B, et al. Hemodynamic assessment during auxiliary heterotopic liver transplantation with portal vein arterialization in a Swine model: preliminary report of 10 transplants. *Transplant Proc.* 2006 Oct;38(8):2603-5.
5. Palenciano CG, Acosta F, Segura B, Sansano T, Ramirez P, Fernandez-Rodriguez O, et al. Hemodynamic changes during reperfusion of the graft in an animal model of liver xenotransplantation. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2441-2.
6. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003 Apr;74(2):86-93.
7. Holzen JP, Palmes D, Langer M, Spiegel HU. Microsurgical training curriculum for learning kidney and liver transplantation in the rat. *Microsurgery.* 2005;25(8):614-23.
8. Lausada NR, Gondolesi GE, Ortiz E, Dreizzen E, Raimondi JC. [Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment]. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2002;32(2):63-70.
9. Matevossian E, Doll D, Huser N, Brauer R, Sinicina I, Nahrig J, et al. Liver transplantation in the rat: single-center experience with technique, long-term survival, and functional and histologic findings. *Transplant Proc.* 2009 Jul-Aug;41(6):2631-6.
10. Pinto Krueh 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. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):3015-8.
11. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008 Dec;14(12):1694-707.

12. Arnault I. Isolated xeno and isoperfused rat liver: experimental procedure and results. *Transplantation*. 2002 Feb 15;73(3):483-4.
13. Monbaliu D, de Vries B, Crabbe T, van Heurn E, Verwaest C, Roskams T, et al. Liver fatty acid-binding protein: an early and sensitive plasma marker of hepatocellular damage and a reliable predictor of graft viability after liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 2005 Jan-Feb;37(1):413-6.
14. Mik EG, Johannes T, Zuurbier CJ, Heinen A, Houben-Weerts JH, Balestra GM, et al. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys J*. 2008 Oct;95(8):3977-90.
15. Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, et al. Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Jul 28;331(4):234-7.
16. Scherer de Fraga, R. Comparação entre Frutose -1,6- Bifosfato e a solução da Universidade de Wisconsin na preservação de fígados de ratos: A proteção contra o dano precoce de isquemia e reperfusão. Dissertação de Mestrado, 2005. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia.
17. Dal Molin, SF. Anestésicos inalatórios e seu efeito sobre o dano de isquemia e reperfusão: Comparação entre isoflurano e sevoflurano em modelo experimental em fígado de ratos. Dissertação de Mestrado, 2005. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia
18. S-Nitroso-n-acetilcisteína na preservação de fígados de ratos: O efeito no dano precoce de Isquemia/Reperfusão. Tese de Doutorado, 2009. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia.
19. Camacho, VR. Isquemia/Reperfusão e Fibrogênese - Um estudo experimental com diferentes soluções de preservação. Tese de Doutorado (a ser defendida em 2010). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Reproducibility for an experimental model of liver reperfusion in rats

Cleber Rosito Pinto Kruel, Raquel Scherer de Fraga, Vera Camacho, Siluê Dal Molin, Mario Reis Álvares-da-Silva, Cleber Dario Pinto Kruel

Study performed at the Animal Experimentation Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

Given the growing population in the liver transplant patient lists worldwide, continued efforts to expand to donor pool are warranted. Experimental models have contributed to the development of new strategies to decrease ischemia/reperfusion injury. The aim of this study is to evaluate the applicability of a new experimental model for studying early damage after liver reperfusion (15 minutes). Methods: A sample containing 42 specimens of reperfused livers obtained from 4 different studies was used to evaluate the applicability of the model). The analysis of applicability was evaluated considering the potential of the model to demonstrate statistically significant differences between groups in laboratorial parameters evaluated. Results: The reperfusion time of 15 minutes was achieved in most of the animals (40 of the 42).The model was able to detect statistically different values between groups in several parameters of tissue lesion and oxidative stress. Conclusion: The novel experimental model is easy reproducible and can be used as an option to screen strategies to minimize ischemia/reperfusion injury.

Introduction

Liver perfusion studies have been conducted since the 19th century, when Claude Bernard first described the conversion of glycogen into glucose in livers perfused with tap water (1). Numerous improvements in the apparatus and technique have been made over the past 60 years with the introduction of separate circuits containing oxygenated blood to perfuse the liver. These models were crucial to a better understanding of the metabolism of important hormones such as insulin, glucagon and cortisol (1). To date, several models have been used to study not only liver metabolism, but also damage caused by ischemia/reperfusion injury and hyperacute rejection in xenotransplantation (2-5). The severity of ischemia/reperfusion-induced damage has been regarded as the main problem in primary organ dysfunction and nonfunction (6). Therefore, experimental research toward further optimization of organ preservation is of utmost importance to expand the donor pool in the current scenario of organ shortage.

Each experimental model has distinct advantages and disadvantages, which should be considered when choosing the experimental design most likely to yield information suitable for testing a specific hypothesis. Hepatocyte isolation and cell culture are non-perfusion methods that reduce the utilization of animal resources, representing a convenient alternative; however, these methods are not suitable for studying hepatic architecture and microcirculation (1). Animal models of hepatic perfusion in closed circuits can mimic most physiological conditions, thus being adopted in the study of ischemia/reperfusion injury, but the absence of inflammatory cells and proinflammatory cytokines may influence the inflammatory response after tissue reoxygenation. *In vivo* models of animal liver transplantation can simulate clinical conditions better than other reperfusion models. However, liver transplantation in small

animals has been a major challenge in experimental surgery, thereby limiting the reproducibility of the experiments (7-9).

In view of the foregoing, there is a real need for an accessible alternative *in vivo* model to evaluate ischemia/reperfusion injury and test potential protective drugs. Within this context, we have recently published an initial experimental study with an *in vivo* model of hepatic reperfusion to examine early events involved in ischemia/reperfusion injury (10). Therefore, the objective of the present study was to analyze an experimental model developed in our institution, and used in four different studies conducted by the same group, to determine whether this is a useful and easily reproducible model to study early reperfusion damage.

Methods

We analyzed the applicability of our recently published experimental model for the evaluation of early ischemia/reperfusion injury in the rat liver. The sample was composed of 42 liver reperfusion procedures performed in our institution in four different studies. All reperfusion procedures were carried out following the same methodological aspects used in the original model (10). The studies were approved by our animal ethic committee.

Analysis of applicability

Several parameters were used to evaluate the applicability of this model. Data obtained from the samples at the end of the reperfusion protocol were considered useful if any of the comparisons achieved statistical significance between groups. Aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) serum levels were analyzed as a measure of hepatocellular injury, following standard methods, and values were expressed as UI/L. Serum and liver tissue TBARS levels were assessed as a measure of oxidative stress, and both values were expressed as nmol/mL. The concentration of liver glutathione peroxidase was measured to evaluate tissue antioxidant capacity. Serum renin activity was measured as a potential marker of fibrogenesis in the last two studies (25 samples). At the end of all experiments, liver samples were fixed in formalin (10%), embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin for microscopic analysis. Immunohistochemical staining for transforming growth factor (TGF)- β 1 and angiotensin II type 1 (AT1) receptor was performed in the last two experiments (25 samples).

Statistics

Means were analyzed for statistical significance by Analysis of Variance (ANOVA) and multiple comparison tests when appropriated (Student-Neuman-Keuls). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Applicability

The model was successfully reproduced in 40 of the 42 procedures performed, accounting for less than 5% of losses. These experiments provided 40 reperfused liver samples, which were analyzed in four different studies. Laboratory parameters were evaluated after 15 minutes of reperfusion, and the resulting data set provided some statistically significant differences between groups (Table 1). A significant difference in the mean value of serum TBARS concentration was observed in a study comparing two inhalational anesthetic agents (isoflurane vs. sevoflurane). Biochemical values of AST, ALT and LDH revealed greater cellular injury in a solution containing fructose-1, 6-bisphosphate than in the UW solution. The evaluation of the effects of N-acetyl-L-cysteine alone and in combination with UW solution showed significant differences regarding serum renin levels. Glutathione concentration was higher in the hepatic tissue of organs preserved with UW solution vs. N-acetyl-L-cysteine. Immunohistochemical and histological analyses were not useful tools for comparing interventions in this specific experimental design.

Table 1: Parameters analyzed in 40 reperfused liver samples divided into groups of five samples

Method	Statistically significant differences (p<0.05)
Serum ALT, AST and LDH level	Lower in UW solution vs. fructose and N-acetyl-L-cysteine solutions
Serum TBARS concentration	Higher levels in isoflurane vs. sevoflurane
Serum renin level	Lower in N-acetyl-L-cysteine vs. UW solution
Liver glutathione concentration	Higher levels in UW vs. N-acetyl-L-cysteine solution
Immunohistochemistry (TGF- β 1 and AT1 receptor)	Negative in all samples

ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate transaminase; AT1 receptor = angiotensin II type 1 receptor; LDH = lactate dehydrogenase; TGF = transforming growth factor; UW = University of Wisconsin.

Discussion

Due to organ shortage, transplant centers are broadening their donor acceptance criteria. As a result, allografts at high risk of primary dysfunction or nonfunction are being used with increasing frequency worldwide (11). However, the concept of donor organ quality represents a continuum of risk rather than good or bad, and new strategies have been tested to optimize liver preservation(12). Within this context, experimental studies seem to be the ideal scenario to test new drugs that target the attenuation of ischemia/reperfusion injury, which is considered to play a crucial role in organ dysfunction. Accordingly, an easily reproducible reperfusion model, in which different markers of early liver damage can be measured, seems to be a useful tool for studying novel protective interventions.

An important issue concerning new experimental models relates to reproducibility. Liver transplantation in small animals is considered an important step in the development of new beneficial drugs. Nevertheless, this challenging surgical procedure is only performed in specialized centers as it requires microsurgical skills. Our research group developed a model of liver reperfusion in rats, but the demonstration that this experimental design could be reproducible was still pending. Therefore, based on the original model, we performed 42 liver reperfusion procedures with the main purpose of evaluating oxidative stress and early liver injury in organs exposed to different interventions. As expected, losses in this experimental stage were minimal (less than 5%), indicating that the reperfusion procedure could be reproduced by other investigators with a small learning curve.

Oxidative stress and early cellular injury following liver reperfusion is a premature event, resulting in biochemical and tissue changes that occur soon after reoxygenation (within the first 30 to 120 minutes). In the model developed by our team, liver reperfusion lasted for 15 minutes, but only a few studies have evaluated ischemia/reperfusion injury in such a short period of time(13, 14). However, in the present study, the biochemical assays (AST, ALT and LDH) revealed that none solution was superior to UW solution in the prevention of hepatocellular damage. Serum TBARS values and liver glutathione levels were useful to detect differences in tissue antioxidant capacity. Although longer reperfusion time is preferable to detect preservation injuries, our model demonstrated that at least some of the biochemical and tissue assays employed can be useful tools in the detection of differences between interventions.

We are aware that our model has some limitations. Reperfusion time is probably one of the most important issues related to the evaluation of oxidative damage. Although some authors have detected metabolites related to primary nonfunction in the first 15 minutes postreperfusion, a longer observation period would be more appropriate to further evaluate

hepatocellular death. The rats were unable to sustain satisfactory liver perfusion for a longer period of time, probably as a result of hypovolemia (15). Therefore, hemodynamic monitoring of the experimental animal and reduced liver mass should be incorporated into the technique aiming to extend the experiment.

In conclusion, we established an ischemia/reperfusion model capable of discriminating differences between pretreated groups regarding serum concentrations of substances associated with poor liver function and fibrogenesis (TBARS and renin), as well as different concentrations of glutathione (antioxidant) in the liver tissue. Considering the feasibility and applicability of this model, we believe that, with some improvements, it may represent a good alternative in the screening of potential beneficial effects of therapeutic interventions that aim to minimize graft injury.

REFERENCES

1. Brouwer KL, Thurman RG. Isolated perfused liver. *Pharm Biotechnol.* 1996;8:161-92.
2. Smrekova R, Vajdova K, Kukan M, Ulicna O, Lutterova M, Wsolova L, et al. A rapid, simple, and cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat. *Transplantation.* 2000 Aug 15;70(3):430-6.
3. Nagel S, Hegemann O, Groneberg DA, Grosse-Siestrup C. An improved model of isolated hemoperfused porcine livers using pneumatically driven pulsating blood pumps. *Toxicol Pathol.* 2005;33(4):434-40.
4. Fernandez-Rodriguez OM, Palenciano CG, Rios A, Martinez L, Arance M, Segura B, et al. Hemodynamic assessment during auxiliary heterotopic liver transplantation with portal vein arterialization in a Swine model: preliminary report of 10 transplants. *Transplant Proc.* 2006 Oct;38(8):2603-5.
5. Palenciano CG, Acosta F, Segura B, Sansano T, Ramirez P, Fernandez-Rodriguez O, et al. Hemodynamic changes during reperfusion of the graft in an animal model of liver xenotransplantation. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2441-2.
6. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003 Apr;74(2):86-93.
7. Holzen JP, Palmes D, Langer M, Spiegel HU. Microsurgical training curriculum for learning kidney and liver transplantation in the rat. *Microsurgery.* 2005;25(8):614-23.
8. Lausada NR, Gondolesi GE, Ortiz E, Dreizzen E, Raimondi JC. [Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment]. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2002;32(2):63-70.

9. Matevossian E, Doll D, Huser N, Brauer R, Sinicina I, Nahrig J, et al. Liver transplantation in the rat: single-center experience with technique, long-term survival, and functional and histologic findings. *Transplant Proc.* 2009 Jul-Aug;41(6):2631-6.
10. Pinto Krueel 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. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):3015-8.
11. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008 Dec;14(12):1694-707.
12. Arnault I. Isolated xeno and isoperfused rat liver: experimental procedure and results. *Transplantation.* 2002 Feb 15;73(3):483-4.
13. Monbaliu D, de Vries B, Crabbe T, van Heurn E, Verwaest C, Roskams T, et al. Liver fatty acid-binding protein: an early and sensitive plasma marker of hepatocellular damage and a reliable predictor of graft viability after liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):413-6.
14. Mik EG, Johannes T, Zuurbier CJ, Heinen A, Houben-Weerts JH, Balestra GM, et al. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys J.* 2008 Oct;95(8):3977-90.
15. Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, et al. Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Jul 28;331(4):234-7.

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO 1: FOTO DA REPERFUSÃO HEPÁTICA

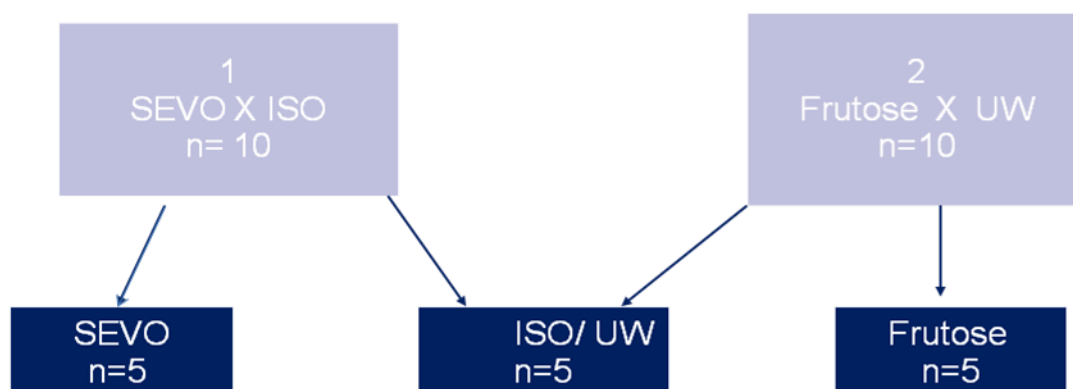


ANEXO 2: CIRURGIA PARA RETIRADA DO FÍGADO

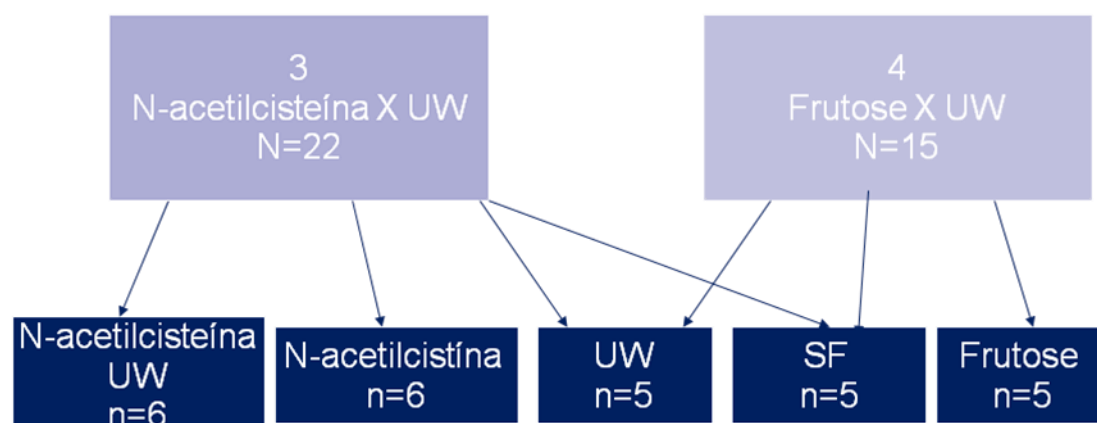


ANEXO 3: ORGANOGRAMA DOS 4 EXPERIMENTOS ANALISADOS

Estudos avaliados



- TGO, TGP e LDH no soro proveniente do efluente hepático
- concentração de TBARS no soro e no tecido hepático
- avaliação histológica



- TGO, TGP e LDH no soro proveniente do efluente hepático
- concentração de TBARS no soro e no tecido hepático
- glutatona no tecido hepático
- renina sérica
- análise imunohistoquímica