

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES APÓS
APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE HIPOTERMIA TÓPICA E PRÉ-
CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
HEPÁTICA EM RATOS**

LARISSE LONGO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE

2014

Larisse Longo

ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES APÓS
APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE HIPOTERMIA TÓPICA E PRÉ-
CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
HEPÁTICA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Longo, Larisse

Análise de marcadores inflamatórios e antioxidantes após aplicação das técnicas de hipotermia tópica e pré-condicionamento isquêmico na lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos / Larisse Longo. -- 2014.

90 f.

Orientador: Jorge Luiz dos Santos.

Coorientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Isquemia/Reperfusão. 2. Pré-condicionamento.
3. Hipotermia Tópica. I. dos Santos, Jorge Luiz, orient. II. Álvares-da-Silva, Mário Reis, coorient.
III. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço carinhosamente a todos os que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão desta dissertação em especial:

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Jorge Luiz dos Santos pelo incentivo, auxílio e confiança depositada em todas as fases desta jornada. Tenho imensa admiração por sua competência e capacidade didática, contribuindo no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, pela coorientação na realização deste projeto, colaborando no seu enriquecimento. Não obstante, devo também meus agradecimentos pela confiança depositada no meu trabalho, ao possibilitar que eu enveredasse pelos caminhos da pesquisa clínica.

A Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira pelo constante aprendizado e apoio. Uma pesquisadora incansável, com energia contagiante. Um exemplo para todos nós.

Ao Dr. Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho e ao Dr. Carlos Otávio Corso pelo auxílio na compreensão das técnicas cirúrgicas e pela parceria científica iniciada.

A Profa. Dra. Norma Anair Possa Marroni e sua aluna Andrea Cristiane Janz Moreira, pela compreensão e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, especialmente nas análises dos dados e interpretação dos resultados obtidos em relação aos mecanismos de defesa antioxidante.

Às colegas Leila Xavier Sinigaglia Fratta e Giovana Regina Weber pelo carinho, competência e dedicação durante as várias horas de trabalho diário, tornando-as mais agradáveis e divertidas. Sempre dispostas a ajudar e contribuir no desenvolvimento deste projeto e que ao longo desta jornada se tornaram amigas e confidentes.

Às minhas colegas e amigas (Thayssa Escobar, Carolina Uribe, Laisa Beduschi, Laura Alencastro de Azevedo, Thais Ortiz Hammes, Renata Leke, Ana Cláudia Schneider, Maria Inês Wilasco, Jacqueline Weis Bonfanti, Juliana Abdalla, Jéssica Ferrari, Silvia Bona e Graziella Rodrigues) do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio laboratorial e científico prestado. Agradeço de coração pela amizade e convivência diária que nos dá ânimo para continuar nesta empreitada, cada uma teve uma participação especial na realização deste trabalho.

Ao pessoal do Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo aprendizado e auxílio nas técnicas laboratoriais desenvolvidas durante este projeto.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela estrutura fornecida no Centro de Pesquisa Experimental, bem como a todos os seus funcionários pela competência.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo constante aprendizado e auxílio dispensados nesta jornada.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro para que esse estudo fosse concluído.

RESUMO

Introdução: A hipotermia tópica (HT) e o pré-condicionamento isquêmico (PCI) são métodos utilizados para diminuir a lesão de isquemia/reperfusão (I/R). A eficácia do uso concomitante da HT e PCI (HT+PCI) no fígado em relação à inflamação e à citoproteção antioxidante não está elucidada. **Objetivo:** Avaliar o processo inflamatório e os mecanismos de segunda linha de defesa antioxidante na lesão de I/R hepática em ratos em relação à utilização das técnicas de HT e PCI de forma isolada ou associada. **Métodos:** Ratos Wistar (n=32) foram submetidos à isquemia hepática parcial (70%) durante 90 minutos seguida por 120 minutos de reperfusão. Os animais foram alocados nos grupos *sham* (n=4), isquemia normotérmica (IN, n=7), PCI (n=7), HT (n=7) e HT+PCI (n=7). O PCI consistiu na aplicação consecutiva de 10 minutos de isquemia e reperfusão antes do insulto isquêmico. A HT foi induzida pela superfusão de solução salina a 26°C sobre os lobos isquêmicos. A eutanásia foi realizada ao término do experimento e as amostras foram coletadas para a realização das análises moleculares utilizando as técnicas de ELISA e *Western Blot*, com o objetivo de comparar os perfis pró-inflamatório, anti-inflamatório e antioxidante. **Resultados:** O grupo HT comparado ao grupo IN apresentou diminuição da concentração do fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-12 e um aumento dos níveis de IL-10. O grupo HT apresentou menor expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e um aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A expressão da *NAD(P)H quinone oxidoreductase-1* (NQO1) foi menor no grupo HT. O PCI não demonstrou diferença significativa em relação a esses marcadores quando comparado ao grupo IN. O

grupo HT+PCI apresentou menor concentração de IL-12 e menor expressão da iNOS e NQO1, mas em relação a estas moléculas a utilização de HT isolada demonstrou um comportamento semelhante. O grupo HT+PCI apresentou maior expressão da *Kelch-like ECH-associated protein (Keap)-1* e menor expressão do *nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)* nuclear e citoplasmático em relação ao grupo IN. **Conclusão:** O método de HT foi eficaz na proteção contra a lesão inicial de I/R. O uso de PCI isolado desencadeou a ativação da segunda linha de defesa antioxidante. A aplicação combinada de HT+PCI não confere benefício adicional em relação ao processo inflamatório quando comparado ao grupo HT, mas apresenta a vantagem de evitar a ativação da segunda linha de defesa antioxidante.

Palavras-chave: isquemia/reperfusão hepática; fígado; hipotermia tópica; pré-condicionamento isquêmico.

ABSTRACT

Background: Topical hypothermia (TH) and ischemic preconditioning (IPC) are used to decrease ischemia/reperfusion (I/R) injury. The effectiveness of using concomitantly TH and IPC (TH+IPC) in liver, regarding inflammation and antioxidant cytoprotection, is lacking. **Aim:** To evaluate the process inflammatory and second-line antioxidant defense mechanisms in hepatic I/R injury in rats in relation to the use of techniques TH and IPC isolate or associated. **Methods:** Wistar rats (n=32) subjected to partial (70%) hepatic ischemia during 90 minutes followed by 120 minutes of reperfusion. Livers from the animals allocated in sham (n=4), normothermic ischemia (NI, n=7), IPC (n=7), TH (n=7) and TH+IPC (n=7) groups. IPC consisted of consecutive 10-minute periods of ischemia and reperfusion before the ischemic insult. TH was induced by the superfusion of cooled saline at 26°C onto the ischemic lobes. Euthanasia was undertaken exactly at the end of the experiment and samples were collected for molecular analyses by ELISA and Western Blot assays, aiming to compare pro-inflammatory, anti-inflammatory and antioxidant profiles. **Results:** Compared with NI, TH presented decreased tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-12 concentrations and increased IL-10 levels. TH displayed lower inducible nitric oxide synthase (iNOS), higher endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expressions. NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1(NQO1) expression was also lower in TH. Isolate IPC showed no differences regarding all these markers compared to NI. TH+IPC showed decreased IL-12 concentration and reduced iNOS and NQO1 expressions, but regarding these molecules isolate TH behaved similarly. TH+IPC showed higher Kelch-like ECH-associated protein (Keap)-

1 and diminished nuclear and cytosolic nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) expressions than NI. **Conclusion:** TH was the effective method of protection against early I/R injury. Isolated IPC entailed triggering of second-line antioxidant defense enzymes. Combined TH+IPC seemed to confer no additional advantage over isolated TH in relation to the inflammatory process, but had the advantage of avoid activation second-line antioxidant defense enzymes.

Keywords: hepatic ischemia/reperfusion; liver; hypothermia-induced; ischemic preconditioning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo ocasionado pelo período de isquemia hepática.	18
Figura 2 - Mecanismos envolvidos na lesão de I/R hepática.....	20
Figura 3 - Processo bifásico dos danos ocasionados pela lesão de I/R.....	22
Figura 4 - Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	28
Figura 5 - Danos ocasionados pela produção de óxido nítrico na I/R hepática.....	30
Figura 6 - Formação dos radicais livres pela via da xantina oxidase.....	32
Figura 7 - Via de sinalização do Nrf2 na regulação da resposta antioxidante.	38
Figura 8 - Proteção bifásica induzida por um período de pré-condicionamento isquêmico.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE: *antioxidant responsive element*

ATP: *adenosine triphosphate*

Ca⁺²: cálcio

CES: células endoteliais sinusoidais

CKs: células de Kupffer

cNOS: *constitutive nitric oxide synthase*

EDRF: *endothelium derived relaxing factor*

eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

ET-1: endotelina-1

GPx: glutationa peroxidase

GST: glutationa S-transferase

HO-1: heme oxigenase-1

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HT: hipotermia tópica

IFN-γ: interferon gamma

IL: interleucina

iNOS: *inducible nitric oxide synthase*

I/R: isquemia/reperfusão

Keap1: *kelch-like ECH-associated protein 1*

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase

Na⁺/K⁺ - ATPase: bomba de sódio e potássio

NF-κB: *nuclear factor kappa beta*

nNOS: *neuronal nitric oxide synthase*

NO: *nitric oxide*

NOS: *nitric oxide synthase*

NQO1: *NAD(P)H quinone oxidoreductase-1*

Nrf2: *nuclear erythroid 2-related factor 2*

O₂⁻: radical superóxido

OH⁻: radical hidroxila

ONOO⁻: peroxinitrito

PCI: pré-condicionamento isquêmico

RLs: radicais livres

sMaf: *small musculoaponeurotic fibrosarcoma*

SOD: superóxido dismutase

STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*

Th: *T helper*

TNF-α: *tumor necrosis factor-α*

TxH: transplante hepático

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Lesões de Isquemia Hepática.....	17
2.2 Lesão de Reperusão Hepática	19
2.3 Citocinas Inflamatórias.....	23
2.4 Óxido Nítrico	26
2.5 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio	30
2.6 Sistemas de Defesa Antioxidante	33
2.7 Via de Sinalização do Nrf2.....	36
2.8 Técnicas de Proteção na Lesão de Isquemia e Reperusão.....	39
2.8.1 Hipotermia.....	39
2.8.2 Pré-Condicionamento Isquêmico	41
2.8.3 Hipotermia Tópica Associada ao Pré-condicionamento Isquêmico.....	45
3. JUSTIFICATIVA	46
4. QUESTÃO DE PESQUISA	47
5. HIPÓTESE	48
6. OBJETIVOS	49
6.1 Objetivo Geral.....	49
6.2 Objetivos Específicos.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	60
9. ORÇAMENTO E FONTES DE FINANCIAMENTO	87
10. CONCLUSÕES	88
11. PERSPECTIVAS	90

1. INTRODUÇÃO

Um determinado tecido está sujeito à isquemia quando se verifica a interrupção ou deficiência no fornecimento sanguíneo, resultando em um aporte insuficiente de oxigênio e nutrientes (Montalvo-Jave *et al.* 2008; Weigand *et al.* 2012). Esse período isquêmico associa-se a disfunção e até mesmo à morte celular, podendo suas consequências serem reversíveis ou irreversíveis, dependendo da causa, da intensidade e do tempo ao qual o tecido esteve sujeito a esse fenômeno (Dinant *et al.* 2007; Knudsen *et al.* 2013). A reperfusão é essencial na prevenção dos danos celulares irreversíveis, contudo diversos estudos têm relatado que as principais lesões desenvolvem-se no período de reperfusão tecidual (Montalvo-Jave *et al.* 2008; Datta *et al.* 2013; Patel *et al.* 2014). Os danos associados à totalidade deste processo denominam-se lesão de isquemia/reperfusão (I/R) (Montalvo-Jave *et al.* 2008; de Rougemont *et al.* 2009).

As lesões de I/R começaram a ser observadas em 1935 por Tennant & Wiggers, os quais notaram que o período de reoxigenação do miocárdio isquêmico em cães era acompanhado por graves arritmias ventriculares (Tennant *et al.* 1935). A lesão de I/R hepática foi caracterizada pela primeira vez por Toledo-Pereyra, *et al.* (1975) e, desde então, inúmeros estudos vem sendo realizados para a avaliação de suas consequências (Kireev *et al.* 2012; Mahmoud *et al.* 2012; Knudsen *et al.* 2013). A lesão de I/R é de crucial importância em algumas situações da prática clínica, como nos casos de transplante hepático (TxH), ressecções hepáticas, cirurgias vasculares, choques hipovolêmico e séptico (Hines *et al.* 2011; Ildefonso *et al.* 2010; Ajamieh *et al.* 2008). Nestas situações, o fígado é submetido à isquemia quente (ou

normotérmica), exceto no TxH, quando o órgão é adicionalmente submetido à isquemia fria (ou hipotérmica) durante o processo de armazenamento em solução de preservação (de Rougemont *et al.* 2009; Teoh 2011; Weigand *et al.* 2012).

O TxH tornou-se um procedimento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves no fígado. Ao longo das últimas décadas, a diferença existente entre o número de pacientes que aguardam um órgão na lista de espera e o número de órgãos disponíveis aumentou drasticamente (de Rougemont *et al.* 2009). Devido a esta pouca oferta, é natural que sejam aceitos órgãos provindos dos chamados “doadores marginais”, ou seja, indivíduos com condições hemodinâmicas limítrofes, presença de infiltração gordurosa significativa, idade avançada, entre outras características que, a despeito dos progressos técnicos, tornam o órgão do doador mais propenso à lesão de I/R (de Rougemont *et al.* 2009; Patel *et al.* 2014). Segundo estimativas, no TxH a lesão de I/R é responsável por 10-30% dos casos de disfunção primária do enxerto (Ildefonso *et al.* 2010).

Por outro lado, o tratamento cirúrgico dos tumores hepáticos tem sido desafiador ao longo dos anos, mas os refinamentos das técnicas cirúrgicas juntamente com a diminuição do sangramento transoperatório proporcionaram diminuição significativa nas taxas de morbimortalidade (Dixon *et al.* 2005; van Gulik *et al.* 2007). O emprego de isquemia para o controle da hemorragia durante a realização das ressecções hepáticas foi inicialmente descrita por Pringle (1908), consistindo na oclusão do pedículo hepático com sua tríade porta. Entretanto, os efeitos deletérios ocasionados pela lesão de I/R no parênquima hepático representam uma situação de risco nestes procedimentos cirúrgicos (Dixon *et al.* 2005; Hoekstra *et al.* 2012).

A lesão hepática após o início da reperfusão é resultado da inter-relação de diferentes mecanismos (Montalvo-Jave *et al.* 2008; Siriussawakul *et al.* 2010). Nos estágios iniciais da reoxigenação tecidual, a associação de edema das células endoteliais, vasoconstrição, adesão leucocitária e agregação plaquetária no interior dos sinusóides promovem a diminuição do fluxo sanguíneo na microcirculação hepática, determinando que áreas do fígado permaneçam isquêmicas mesmo após o período de reperfusão (Siriussawakul *et al.* 2010; Klune *et al.* 2010; Datta *et al.* 2013). Estas alterações são responsáveis pela ativação das células de Kupffer (CKs) e neutrófilos que atuam na produção e liberação de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), moléculas responsáveis pelo agravamento do dano tecidual (Clarke *et al.* 2009; Klune *et al.* 2010; Ben Abdennebi *et al.* 2011). Quando a lesão de I/R é muito intensa, além da disfunção hepática, pode-se desencadear uma resposta sistêmica, danificando órgãos, como pulmões e rins (Duran *et al.* 2009; Ge *et al.* 2013; Nastos *et al.* 2014).

Com o enfoque de proteger os órgãos das lesões ocasionadas pelo processo de I/R, diversos métodos terapêuticos têm sido empregados (Clavien *et al.* 2003; Behrends *et al.* 2006; Hoekstra *et al.* 2012; Patel *et al.* 2014). Entre estas estratégias podemos citar a indução da hipotermia e a técnica de pré-condicionamento isquêmico (PCI), a qual consiste na aplicação de curtos períodos de isquemia separados pela reperfusão intermitente (Clavien *et al.* 2003; Grezzana Filho *et al.* 2011). É possível que a aplicação destas técnicas de forma isolada ou sinérgica possa auxiliar na redução das lesões ocasionadas pela I/R hepática.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesões de Isquemia Hepática

Quando há isquemia, por definição, ocorre a ausência de fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, hipóxia tecidual (Glantzounis *et al.* 2005; Montalvo-Jave *et al.* 2008). O primeiro mecanismo afetado pelo período de isquemia é a respiração celular aeróbica, levando à redução da fosforilação oxidativa e à diminuição da geração de trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), ocasionando o acúmulo dos subprodutos de sua degradação, como a xantina e a hipoxantina (Ildefonso *et al.* 2010; Datta *et al.* 2013). Paralelamente, a redução do ATP bloqueia o funcionamento da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ -ATPase) aumentando, neste caso, o influxo de sódio e conseqüentemente de água para o interior dos hepatócitos, o que ocasiona edema celular e ativação de enzimas hidrolíticas, substâncias lesivas às células (Figura 1) (Alchera *et al.* 2010; Min *et al.* 2011; Weigand *et al.* 2012).

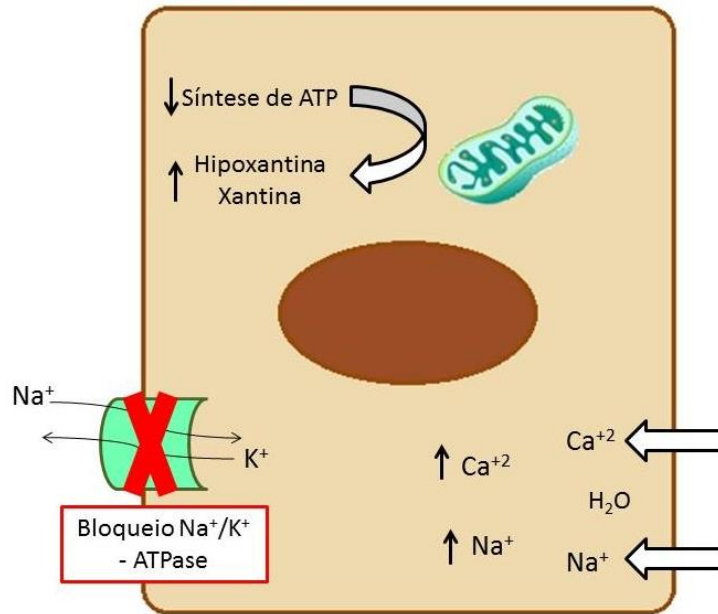


Figura 1 - Processo ocasionado pelo período de isquemia hepática. No período de isquemia ocorre à redução da geração de ATP ocasionando o acúmulo dos subprodutos de sua degradação, como a xantina e a hipoxantina. Paralelamente a redução do ATP bloqueia o funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase promovendo o acúmulo de Ca^{+2} intracelular e edema celular. Abreviaturas - ATP: trifosfato de adenosina; Na^+/K^+ -ATPase: bomba de sódio e potássio; Ca^{+2} : cálcio; K^+ : potássio; Na^+ : sódio; H_2O : água.

O acúmulo intracelular de cálcio (Ca^{+2}) também está fortemente associado ao desenvolvimento das lesões isquêmicas e parece ser um evento crucial para a progressão dos danos celulares (Weigand *et al.* 2012; Alchera *et al.* 2010; Glantzounis *et al.* 2005). O aumento de seus níveis, em decorrência da diminuição do seu transporte ativo dependente de ATP, causa a ativação de fosfolipases e proteases (Glantzounis *et al.* 2005; Ildefonso *et al.* 2010; Klune *et al.* 2010). As fosfolipases ativam a transformação do ácido araquidônico, dando origem a mediadores inflamatórios como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxano,

substâncias que desencadeiam a vasoconstrição, ativação e adesão neutrofílica e plaquetária. Por sua vez, as proteases potencializam a geração dos radicais livres (RLs) durante o período de reperfusão tecidual (Klune *et al.* 2010; Ildefonso *et al.* 2010).

Sabe-se que as lesões provocadas durante o período de isquemia, em diferentes tecidos, apresentam relação com sua intensidade (Duran *et al.* 2009; Knudsen *et al.* 2013). A supressão do oxigênio, durante um curto período de tempo, ocasiona danos geralmente reversíveis à célula, caso contrário, a disfunção tecidual progride, podendo levar à morte celular (Siriussawakul *et al.* 2010). Embora a restauração do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico seja essencial para a preservação dos danos celulares, estudos têm demonstrado que as principais lesões desenvolvem-se durante o estágio de reoxigenação tecidual, decorrente do período de reperfusão (Siriussawakul *et al.* 2010; Glantzounis *et al.* 2005; Datta *et al.* 2013).

2.2 Lesão de Reperfusão Hepática

A reperfusão hepática pode levar à disfunção da microcirculação decorrente dos danos ocasionados às células endoteliais e por um desequilíbrio entre a expressão de moléculas vasoconstritoras e vasodilatadoras, tais como a endotelina-1 (ET-1) e o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) (Ben Abdennebi *et al.* 2011; Montalvo-Jave *et al.* 2008; Datta *et al.* 2013). Este desarranjo promove o fenômeno de falha de perfusão do órgão (“no reflow”) associada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, acúmulo de subprodutos tóxicos, agregação plaquetária e

neutrófilica, os quais, em conjunto, provocam o aumento da vulnerabilidade tecidual (Figura 2) (Clarke *et al.* 2009; Montalvo-Jave *et al.* 2008).

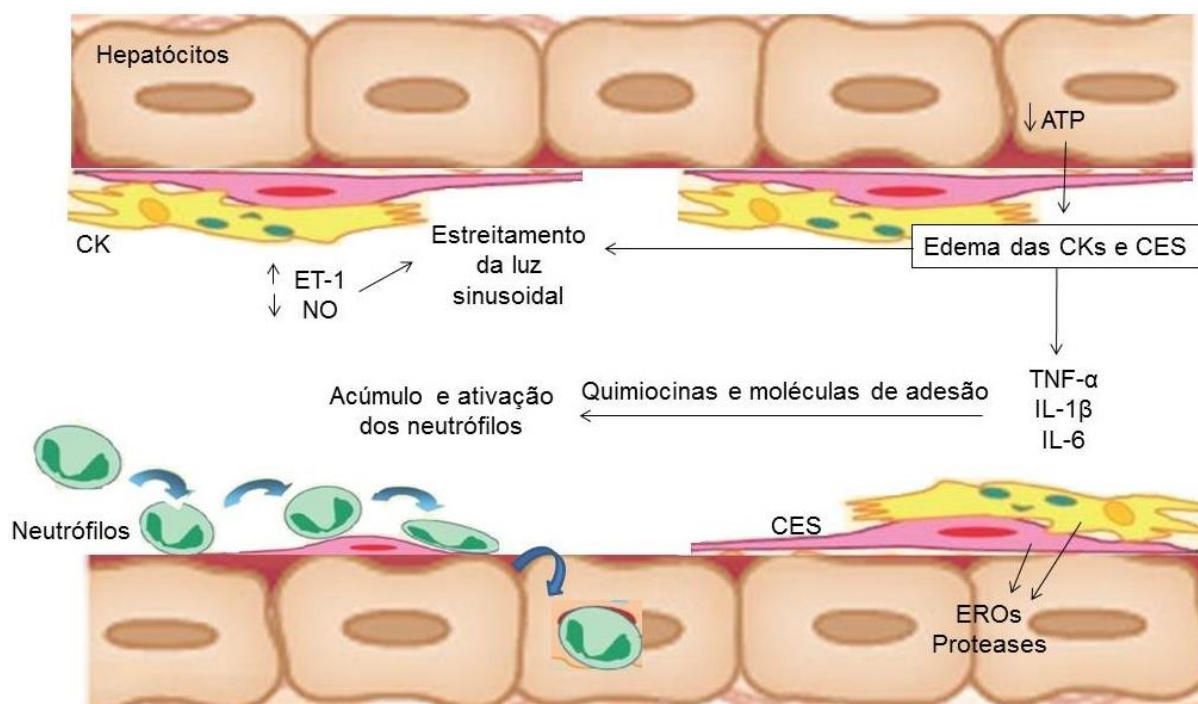


Figura 2 - Mecanismos envolvidos na lesão de I/R hepática. O desequilíbrio entre a expressão das moléculas NO e ET-1 ocasiona o fenômeno de falha de perfusão do órgão, após o período de reperfusão tecidual, que juntamente com a produção de mediadores inflamatórios e radicais citotóxicos promove a lesão de I/R. Abreviaturas - ATP: trifosfato de adenosina; CES: células endoteliais sinusoidais; CKs: células de Kupffer; EROs: espécies reativas de oxigênio; ET-1: endotelina-1; IL: interleucina; NO: óxido nítrico; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . Fonte: adaptado de Siriussawakul *et al.* 2010.

Jaeschke *et al.* (1990) foram os primeiros a descrever e caracterizar as duas distintas fases da lesão de I/R no fígado e, desde então, diversos estudos têm

corroborado com suas observações (Teoh 2011; Diesen *et al.* 2011; Clarke *et al.* 2009). Os danos da I/R caracterizam um processo bifásico incluindo uma fase inicial ou precoce, que abrange as primeiras seis horas e uma fase tardia, que se estende até 48 horas após o período de reperfusão (Chattopadhyay *et al.* 2009; Teoh 2011; Klune *et al.* 2010; Datta *et al.* 2013).

O restabelecimento da oferta de oxigênio no período inicial de reperfusão ocasiona o aparecimento de estresse oxidativo, cuja gravidade depende do tempo em que o órgão permaneceu em isquemia. O radical superóxido (O_2^-), a hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são os principais representantes da EROs, produzidos pelas CKs e pelos polimorfonucleares aderidos ao endotélio vascular (Diesen *et al.* 2010; Weigand *et al.* 2012; Montalvo-Jave *et al.* 2008). As CKs constituem as principais responsáveis pela geração destas EROs na fase precoce de I/R, porém com o agravamento da lesão ao longo do tempo, os neutrófilos ativados intensificam a sua produção (Teoh 2011; Ildefonso *et al.* 2010; Patel *et al.* 2014).

Na fase precoce de reperfusão, as CKs ativadas também produzem e liberam mediadores pró-inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- α*), interleucina (IL)-1 β e IL-6, amplificando a lesão celular (Ellett *et al.* 2010; Mahmoud *et al.* 2012; Glantzounis *et al.* 2005). Durante a fase tardia de reperfusão, há maior ativação das CKs, resultando em intenso processo inflamatório com a participação de diversos mediadores, os quais interagem, provocando a infiltração do parênquima hepático pelos neutrófilos ativados, levando a apoptose e necrose celulares (Figura 3) (Jaeschke *et al.* 1990; Clarke *et al.* 2009; de Rougemont *et al.* 2009).

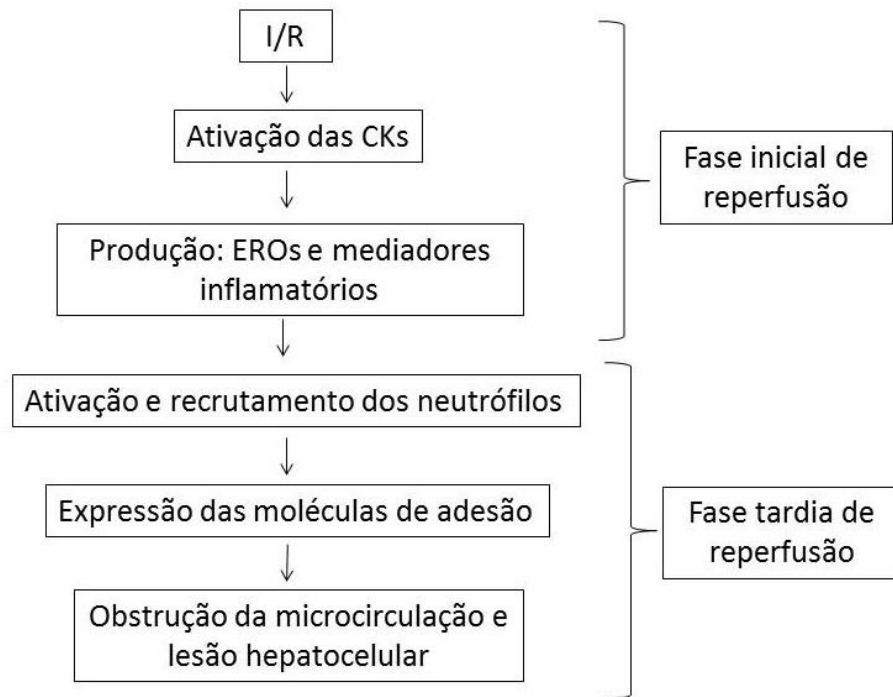


Figura 3 - Processo bifásico dos danos ocasionados pela lesão de I/R. Abreviaturas – CKs: células de Kupffer; EROs: espécies reativas de oxigênio; I/R: isquemia/reperfusão. Fonte: adaptado de Clarke *et al.* 2009.

Os mediadores pró-inflamatórios e as EROs são os principais responsáveis pelo recrutamento dos polimorfonucleares ao parênquima hepático. A interação entre os neutrófilos ativados e as células endoteliais sinusoidais (CES) ocorre através das moléculas de adesão, que podem ser divididas em três principais famílias: as selectinas, a superfamília das imunoglobulinas e as integrinas, as quais são responsáveis pela fixação e migração dos neutrófilos através do endotélio hepático (Siriussawakul *et al.* 2010; Phillips *et al.* 2009; Peralta *et al.* 2001).

2.3 Citocinas Inflamatórias

As citocinas desempenham papel fundamental na lesão de I/R, por serem responsáveis pela mediação e regulação da resposta inflamatória, agravando os danos celulares ou, ao contrário, atuando como bloqueadoras desta resposta (Mahmoud *et al.* 2012; Dinant *et al.* 2007; Kireev *et al.* 2012). São pleiotrópicas e podem atuar de forma autócrina ou parácrina (Siriussawakul *et al.* 2010; Mahmoud *et al.* 2012).

O TNF- α foi inicialmente descrito como indutor da necrose de células tumorais, porém atualmente é reconhecido como uma importante citocina pró-inflamatória (Chu 2013; Mahmoud *et al.* 2012). Esse mediador é produzido e liberado pelas CKs ativadas no período inicial de I/R, apresentando importante papel na quimiotaxia e na indução da produção de EROs (Klune *et al.* 2010; Glantzounis *et al.* 2005). Mahmoud *et al.* (2012) demonstraram que a inibição do TNF- α promove a redução da expressão do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa beta*), molécula responsável pela transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória. Outros estudos relataram que o recrutamento de neutrófilos a partir do estímulo deste mediador pró-inflamatório, promove o aumento da expressão de moléculas de adesão celular, considerado um importante mecanismo no processo de lesão endotelial observado na lesão de I/R hepática (Peralta *et al.* 2001; Jaeschke 2006; Taki-Eldin *et al.* 2012).

A IL-1 β desempenha papel central na regulação das respostas imune e inflamatória. Esse mediador é produzido principalmente pelas CKs e hepatócitos, com a colaboração de outras células (Ellett *et al.* 2010; Diesen *et al.* 2011). No

contexto da lesão de I/R, a IL-1 β apresenta função semelhante ao TNF- α , promove a expressão de outras citocinas e quimiocinas, além de regular a produção dos RLs e auxiliar o recrutamento e adesão dos neutrófilos às CES (Klune *et al.* 2010; Montalvo-Jave *et al.* 2008). A expressão da IL-1 β aumenta na fase inicial de reperfusão hepática, de modo sincrônico ao TNF- α (Suzuki *et al.* 1994; Lentsch *et al.* 1999; Wanner *et al.* 1996). Shito *et al.* (1997) demonstraram que ratos submetidos ao tratamento com o antagonista do receptor da IL-1 apresentaram menor produção de TNF- α , protegendo o tecido hepático da lesão ocasionada pela I/R.

Outro importante mediador inflamatório é a IL-6, molécula produzida de forma abundante durante a fase precoce da lesão de I/R, juntamente com o TNF- α e a IL-1 β (Kireev *et al.* 2012; Wanner *et al.* 1996). Cui *et al.* (2013) sugeriram que a IL-6 constitui um importante indicador do processo inflamatório e do dano tecidual e que a diminuição de sua expressão protegeria o órgão das lesões ocasionadas pela I/R. Outros estudos demonstraram que a ativação da IL-6, levando à ligação deste mediador ao seu receptor nos hepatócitos, ocasiona a ativação e a translocação nuclear do fator de transcrição, STAT3 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*) (Camargo *et al.* 1997; Matsumoto *et al.* 2006). Essa ativação induz a expressão de proteínas mitogênicas e anti-apoptóticas, contribuindo para a recuperação e a regeneração dos hepatócitos após a lesão de I/R.

A identificação e a purificação da IL-12 foi realizada por Kobayashi *et al.* (1989), através da estimulação de células infectadas com o vírus Epstein-Barr. Sua estrutura molecular é composta de um dímero glicoproteico com peso de 70 kDa formado por duas subunidades de 35 kDa e 40 kDa unidas por pontes de dissulfeto. Sua expressão pelos hepatócitos afetados durante o período isquêmico e na fase

inicial de reperfusão parece ser crucial para a produção de outras citocinas inflamatórias no período de reoxigenação tecidual (Clarke *et al.* 2009; Lentsch *et al.* 1999). Lentsch *et al.* (1999) realizaram o primeiro estudo para investigar o papel desse mediador na lesão de I/R hepática, demonstrando que ratos tratados com anticorpos neutralizantes de IL-12 apresentaram redução na expressão de TNF- α e interferon- γ (IFN- γ), promovendo a diminuição do recrutamento de neutrófilos para o parênquima hepático.

Outra molécula de destaque secretada durante a lesão de I/R é a IL-10, potente citocina anti-inflamatória, descrita por Fiorentino *et al.*, em 1989. Esses pesquisadores relataram a existência de uma substância que estava presente no sobrenadante dos cultivos celulares de linfócitos T *helper* (Th) 2, e que era capaz de inibir a expressão de citocinas produzidas por células Th1. Esta molécula foi denominada de “fator inibidor da síntese de citocinas”, mas posteriormente passou a ser chamada de IL-10, a partir de sua caracterização em termos imunológico e bioquímico (Moore *et al.* 1990). Importante mediador imunossupressor produzido por vários tipos de células do sistema de defesa, incluindo CKs, linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, além de células dendríticas, a IL-10 inibe a expressão dos mediadores inflamatórios formados durante a lesão de I/R, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12 (Dinant *et al.* 2007; Ellett *et al.* 2010; Saraiva *et al.* 2010).

Kireev *et al.* (2012) realizaram um estudo visando comparar o processo inflamatório desenvolvido pela lesão de I/R em ratos de duas faixas etárias diferentes, jovens de 2 meses e velhos de 14 meses, representando esta última faixa etária a idade de 50 anos nos seres humanos. Demonstraram que ratos mais velhos apresentaram um aumento na expressão dos mediadores inflamatórios IL-1 β ,

IFN- γ e da proteína quimiotática de monócitos associada à diminuição da expressão da IL-10, quando comparados aos animais jovens. Estes pesquisadores concluíram que os efeitos danosos da lesão de I/R intensificam-se com o envelhecimento (Kireev *et al.* 2012). A ativação da IL-10 durante a lesão de I/R suprime a atividade do NF- κ B e, conseqüentemente, as expressões do TNF- α e de outros mediadores inflamatórios, protegendo o órgão dos danos celulares ocasionados nesta situação (Dinant *et al.* 2007; Yoshidome *et al.* 1999; Kireev *et al.* 2012).

Durante a lesão de I/R, a liberação de mediadores pró-inflamatórios, a ativação dos polimorfonucleares e a produção de agentes oxidantes não só danificam o fígado, como também produzem uma síndrome inflamatória sistêmica que, nos casos mais graves, levam à disfunção de órgãos remotos (Hsu *et al.* 2012; Duran *et al.* 2009; Nastos *et al.* 2014).

2.4 Óxido Nítrico

A descoberta do NO foi realizada em 1772 pelo químico Joseph Priestly, sendo descrito como um gás incolor e com tempo de meia vida entre 6-10 segundos (Yetik-Anacak *et al.* 2006). Em 1980, Furchogott & Zawadzki demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina era dependente da presença de células endoteliais, mediado por um fator humoral lábil, reconhecido posteriormente como “fator relaxante derivado do endotélio” (EDRF, do inglês *endothelium derived relaxing factor*). Com a realização de novos estudos, o EDRF foi caracterizado como sendo o NO, pois ambas as moléculas induziam a um relaxamento vascular pelo

mesmo mecanismo biológico e apresentavam características químicas idênticas (Ignarro *et al.* 1987).

O NO é considerado um RL por apresentar um elétron não emparelhado no seu orbital externo, o que lhe confere uma alta reatividade, especialmente frente às moléculas de oxigênio e o O_2^- , produzindo as ERNs (Abu-Amara *et al.* 2012; Diesen *et al.* 2010; Phillips *et al.* 2009). Importante mediador biológico, o NO é produzido por vários tipos de células que apresentam a capacidade de sintetizar substâncias envolvidas na modulação do tônus vascular, causando o relaxamento muscular e a vasodilatação. O NO, além disso, inibe a agregação plaquetária, a aderência neutrofílica e atua como modulador da permeabilidade vascular (Diao *et al.* 2012; Abu-Amara *et al.* 2012; Yetik-Anacak *et al.* 2006).

Palmer & Moncada (1989) relataram que NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas de óxido nítrico sintases (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) responsáveis por converter o aminoácido L-arginina em radical ON e L-citrulina na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADPH) e oxigênio (Figura 4). Diversos estudos têm demonstrado que a suplementação de L-arginina na vigência de I/R hepática protege o órgão, melhorando a microcirculação, por promover a vasodilatação, atenuar o acúmulo de neutrófilos e prevenir a morte celular (Diao *et al.* 2012; Taha *et al.* 2012; Chattopadhyay *et al.* 2009).

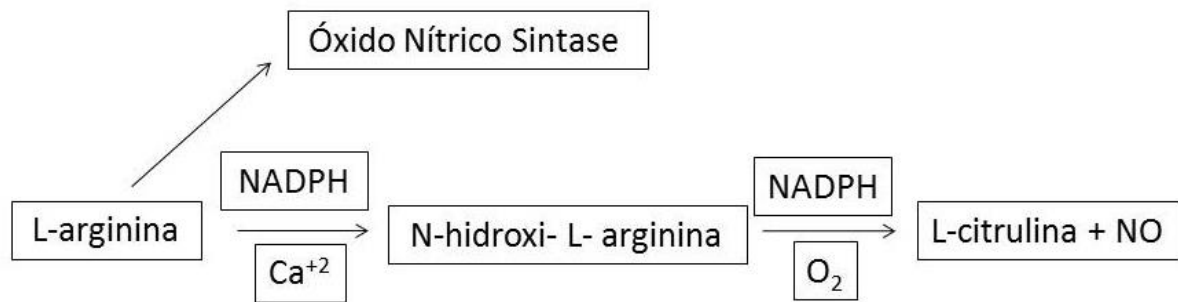


Figura 4 - Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina. Abreviaturas - Ca⁺²: cálcio; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase; O₂: oxigênio, NO: óxido nítrico.

A enzima NOS apresenta três isoformas: duas constitutivas - cNOS (do inglês, *constitutive nitric oxide synthase*), reguladas pelo complexo de Ca⁺² e uma induzível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*) (Yetik-Anacak *et al.* 2006; Ben Abdennebi *et al.* 2011). As isoformas da cNOS encontram-se expressas nas células neuronais (nNOS, do inglês *neuronal nitric oxide synthase*) e nas células endoteliais (eNOS, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*) e produzem NO em pequenas quantidades (Kireev *et al.* 2012; Abu-Amara *et al.* 2012). No entanto, a isoforma iNOS não está presente em condições fisiológicas, ocorrendo sua ativação em resposta a estímulos inflamatórios pelas CKs, células endoteliais e hepatócitos (Abu-Amara *et al.* 2012; Glantzounis *et al.* 2005). Quando expressada, a iNOS é capaz de induzir a produção de grandes quantidades de NO, por um longo tempo, caracterizando o seu envolvimento em diversos processos patológicos (Diesen *et al.* 2010; Kireev *et al.* 2012). Existem duas principais isoformas da NOS no fígado: eNOS e a iNOS (Datta *et al.* 2013; Glantzounis *et al.* 2005). Em condições fisiológicas somente a eNOS está presente e o nível de NO produzido por esta

isoforma é adequado à prevenção da síntese de mediadores inflamatórios, do acúmulo de polimorfonucleares e da agregação plaquetária (Diesen *et al.* 2011; Ben Abdennebi *et al.* 2011; Abu-Amara *et al.* 2012).

Na lesão de I/R, os efeitos da produção do NO derivado da iNOS podem ser tóxicos ou protetores, na dependência do tipo de agressão, do nível e da duração de sua expressão (Diesen *et al.* 2010; Diesen *et al.* 2011; Glantzounis *et al.* 2005). Esta molécula não se encontra expressa em condições basais normais e sua indução exige algum tempo (Hur *et al.* 1999). Em função de sua produção excessiva em condições pró-inflamatórias, o NO, por ser um RL, consegue reagir como o O_2^- , resultando na produção de um poderoso oxidante, o peroxinitrito ($OONO^-$), que sinaliza a ocorrência de toxicidade e a perda da função protetora (Abu-Amara *et al.* 2012; Siriussawakul *et al.* 2010; Hines *et al.* 2011). Esta perda resulta em disfunção endotelial, causando danos celulares mediante diversos mecanismos, tais como a peroxidação dos lipídeos e a alterações na cadeia de transporte de elétrons (Figura 5) (Diesen *et al.* 2010; Ben Abdennebi *et al.* 2011).

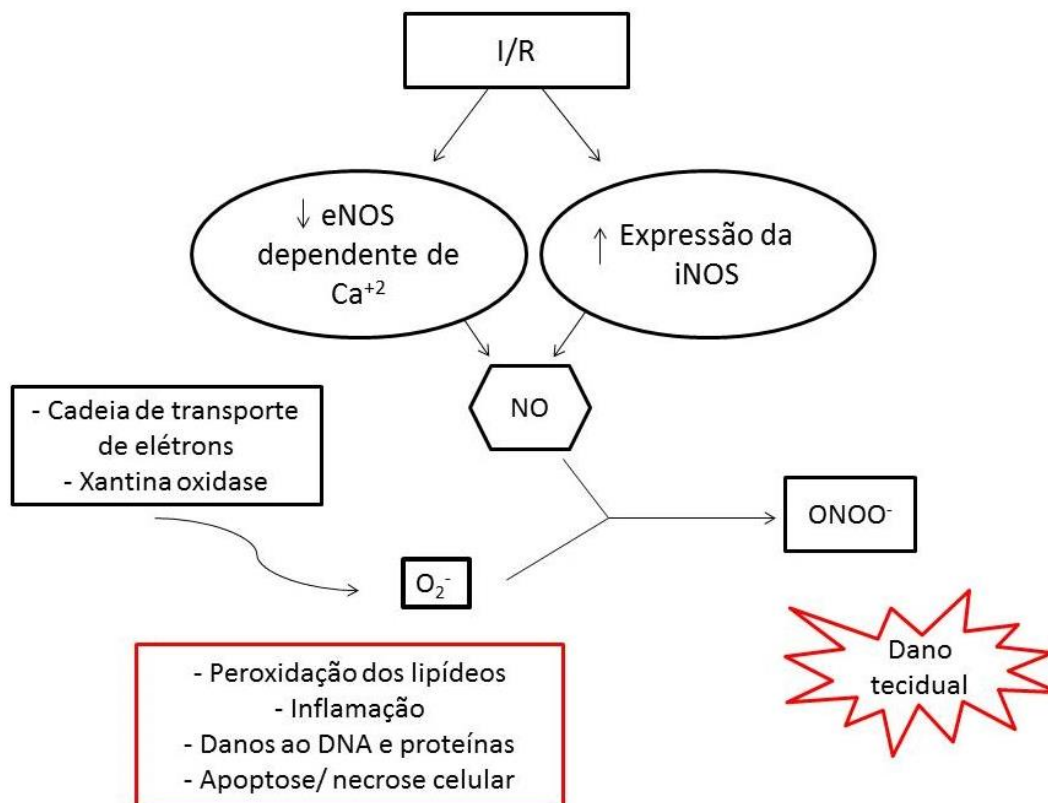


Figura 5 - Danos ocasionados pela produção de óxido nítrico na I/R hepática. Abreviaturas - Ca^{+2} : cálcio; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; I/R: isquemia/reperfusão; NO: óxido nítrico; O_2^- : radical superóxido; ONOO^- : peroxinitrito. Fonte: adaptado de Ben Abdennebi *et al.* 2011.

Em condições basais, o NO derivado da eNOS exerce um efeito protetor, enquanto que o NO produzido em grandes quantidades a partir da isoforma iNOS exacerba os danos ocasionados pela lesão de I/R, devido a produção de radicais citotóxicos (Ildefonso *et al.* 2010; Klune *et al.* 2010).

2.5 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

O oxigênio, molécula biológica mais importante para a aerobiose, é também a principal fonte para a formação de RLs, devido à sua alta disponibilidade (Ildefonso

et al. 2010). O termo RL refere-se a um átomo, ou molécula, altamente reativa que contém um ou mais elétrons não emparelhados no seu orbital externo como, por exemplo, o O_2^- , o OH^- e o NO (Diesen *et al.* 2010; Glantzounis *et al.* 2005). Outras espécies intermediárias do metabolismo do oxigênio e do ON não são considerados RLs por não apresentarem elétrons desemparelhados em sua última camada de valência e são classificados como EROs ou ERNs, sendo os exemplos mais representativos o H_2O_2 e o $ONOO^-$ (Glantzounis *et al.* 2005; Diesen *et al.* 2010).

A lesão hepática induzida pelo processo de I/R é causada, parcialmente, pela formação e liberação das EROs e ERNs, sendo a gravidade dos danos ocasionados dependente, em parte, do tempo em que o órgão permaneceu em isquemia (de Rougemont *et al.* 2009). O mecanismo da xantina oxidase é um dos mais amplamente estudados no que tange à formação destas espécies reativas na lesão de I/R (McCord 1985).

A primeira alteração metabólica que ocorre no período de isquemia tecidual é a redução da disponibilidade de ATP em decorrência da sua degradação em hipoxantina e xantina (Jaeschke *et al.* 2012). Além disso, o acúmulo de Ca^{+2} intracelular promove a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, a qual se relaciona com a produção de RLs (Ildefonso *et al.* 2010; Weigand *et al.* 2012). No período de reperfusão tecidual, com a reintrodução do oxigênio, os subprodutos da degradação do ATP são metabolizados pela via da xantina oxidase, produzindo grandes quantidades de O_2^- e H_2O_2 (Figura 6). Também neste período e na presença dos íons ferro ou cobre, ocorre a formação do OH^- , através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Diesen *et al.* 2010).

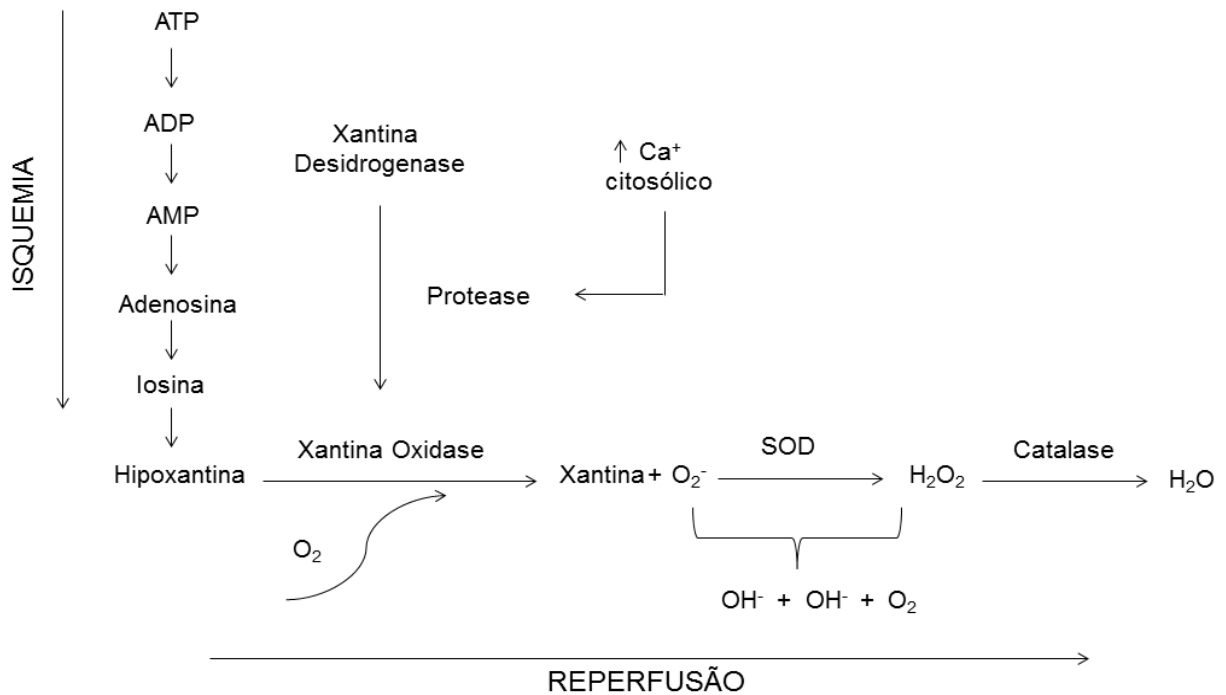


Figura 6 - Formação dos radicais livres pela via da xantina oxidase.

Abreviaturas: ATP: trifosfato de adenosina; ADP: difosfato de adenosina; AMP: monofosfato de adenosina; Ca⁺: cálcio; O₂: oxigênio; O₂⁻: radical superóxido; OH·: radical hidroxila; H₂O: água; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; SOD: superóxido dismutase. Fonte: adaptado de Pinheiro *et al.* 1999.

A disfunção tecidual ocasionada pelo período de isquemia pode prejudicar ou impedir a liberação adequada do NO. Durante o período de reoxigenação com o aumento de sua disponibilidade, o NO reage com outras moléculas, entre as quais o O₂⁻, funcionando como *scavenger* ou varredor de RLs, com o objetivo de neutralizar os RLs formando compostos menos tóxicos (Siegel *et al.* 2004). Contudo, a reação que ocorre entre o NO e o O₂⁻ resulta na formação do ONOO⁻, um agente instável e com alto poder oxidativo (Abu-Amara *et al.* 2012; Diesen *et al.* 2010).

Os RLs e as espécies reativas formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares (Montalvo-Jave *et*

al. 2008). Entretanto, distúrbios no equilíbrio entre a formação de substâncias oxidantes e as das defesas antioxidantes, a favor dos oxidantes promove o estresse oxidativo (Diesen *et al.* 2010). As consequências do estresse oxidativo na lesão de I/R, costumam ser deletérias, pois os agentes oxidantes lesam diretamente as células por ocasionar alterações na permeabilidade da membrana celular, perda da seletividade iônica e liberação do conteúdo das organelas, culminando na lise celular (Jaeschke *et al.* 2012; Patel *et al.* 2014; Weigand *et al.* 2012). Todas as células, quando expostas ao estresse oxidativo, iniciam mecanismos celulares de defesa antioxidante visando compensar a formação dos RLs e, deste modo, conter os danos provocados pela sua acumulação (Jaeschke *et al.* 2012; Glantzounis *et al.* 2005).

2.6 Sistemas de Defesa Antioxidante

As EROs e as ERNs são geradas constantemente durante a lesão de I/R, através: 1) da cadeia de transporte de elétrons, 2) pela via da xantina oxidase, 3) durante a resposta inflamatória pela ativação das CKs e neutrófilos, ou 4) pela conversão do NO a ONOO⁻ (Hines *et al.* 2011; Jaeschke *et al.* 2012). A produção dessas espécies reativas pode ocasionar danos irreversíveis à célula, sendo assim as defesas antioxidantes são necessárias para a manutenção da homeostase celular (Jaeschke *et al.* 2012; Uysal *et al.* 2014; Hsu *et al.* 2012).

Conceitua-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com aquelas de um substrato passível de ser oxidado, retarda ou evita de forma significativa a oxidação desse substrato (Ge

et al. 2013; Glantzounis *et al.* 2005). Os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos (Glantzounis *et al.* 2005). As principais moléculas envolvidas no sistema de defesa antioxidante não enzimático incluem os compostos ingeridos através da dieta regular ou de suplementação, tais como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor da vitamina A), entre outros, os quais atuam inibindo a propagação dos RLs (Jaeschke *et al.* 2012; Diesen *et al.* 2010; Hsu *et al.* 2012).

Em 1954, Gerschman *et al.* propuseram que a maioria dos efeitos danosos causados pelas concentrações elevadas de oxigênio nos organismos vivos poderia ser atribuída à formação dos RLs. Essa proposta não foi universalmente aceita até a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), realizada no ano de 1969 por MacCord & Fridovich, quando se demonstrou a participação do sistema antioxidante enzimático na manutenção da homeostase celular. A SOD, juntamente com a catalase e a glutathione peroxidase (GPx), promove a primeira linha de defesa contra os RLs formados durante a lesão de I/R (Glantzounis *et al.* 2005). Cada uma destas substâncias desempenha um papel específico no controle do balanço oxidativo (Diesen *et al.* 2010). A SOD atua na dismutação do radical O_2^- formando o H_2O_2 e oxigênio, enquanto a remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas catalase e GPx, agindo simultaneamente com a proteína glutathione na redução de H_2O_2 em água (Glantzounis *et al.* 2005; de Rougemont *et al.* 2009).

A segunda linha de defesa antioxidante enzimática é acionada no eventual fracasso da primeira linha de ação, com a função de estabilizar os RLs formados, minimizando seus efeitos deletérios. Geralmente as enzimas citoprotetoras dessa segunda linha de proteção são expressas através da sinalização do fator nuclear do

eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2, do inglês *nuclear erythroid 2-related factor 2*) sobre o elemento responsivo a antioxidantes (ARE, do inglês *antioxidant responsive element*), situado no núcleo da célula (Morales *et al.* 2014; Shokeir *et al.* 2013). Esse fator nuclear, ao ser ativado, codifica enzimas de resposta ao estresse, dentre as quais se destacam a glutathiona S-transferase (GST), a heme oxigenase-1 (HO-1) e a NAD(P)H: quinona oxidoreductase-1 (NQO1, do inglês *NAD(P)H quinone oxidoreductase-1*) (Shokeir *et al.* 2013; Jaeschke *et al.* 2012).

A NQO1, cujas propriedades catalíticas foram descritas pela primeira vez por Ernster & Navazio em 1958, constitui uma enzima citosólica que desempenha inúmeras funções. Age como antioxidante por catalisar a redução de dois elétrons das quinonas formando hidroquinonas e evitando assim a produção de EROs (Siegel *et al.* 2004). Atua também como proteína citoprotetora por reduzir a depleção dos grupos sulfidrilas e como quimioprotetora por participar da detoxicação de xenobióticos, juntamente com outras enzimas antioxidantes (Siegel *et al.* 2004; Gang *et al.* 2014).

Na lesão I/R, a NQO1 atua como antioxidante sinérgico à SOD, desempenhando papel de *scavenger* do O_2^- no ciclo oxidativo do oxigênio (Gang *et al.* 2014). Conforme comprovado por Siegel *et al.* (2004), a atuação das enzimas SOD e NQO1, promovem a dismutação do O_2^- , protegendo as células contra a formação das EROs e ERNs. Utilizando um modelo de I/R renal em camundongos *knockout* para a NQO1, Gang *et al.* (2013), ao analisar a função da NADPH oxidase, demonstraram a existência de alterações no estado redox da célula, devido o acúmulo desta última molécula. A NADPH oxidase funciona como cofator participante da geração de EROs, tais como os ânions O_2^- e H_2O_2 . Quando ativada a

enzima antioxidante NQO1, promove a diminuição da disfunção renal e do estresse oxidativo na lesão de I/R renal através do bloqueio da NADPH oxidase.

Entre os mecanismos pelos quais o estresse oxidativo associa-se à disfunção tecidual da lesão de I/R, incluem-se os danos ocasionados aos lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) (Ben Abdennebi *et al.* 2011) e abordagens antioxidantes utilizando substâncias tais como α -tocoferol, SOD, alopurinol e N-acetilcisteína estão sendo amplamente estudadas no intuito de prevenir ou minimizar a injúria e aumentar a viabilidade tecidual (Patel *et al.* 2014; Uysal *et al.* 2014; Jaeschke *et al.* 2012).

2.7 Via de Sinalização do Nrf2

Entre as moléculas reguladoras do sistema antioxidante e da resposta celular ao estresse oxidativo ocasionados pela lesão de I/R especificamente da segunda linha de defesa antioxidante, destaca-se o fator de transcrição Nrf2 (Jaeschke *et al.* 2012; Shokeir *et al.* 2013). Em condições fisiológicas, o Nrf2 localiza-se no citoplasma juntamente com as duas moléculas de seu repressor proteína de citoesqueleto Keap1 (do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein 1*), formando um complexo inativo (Morales *et al.* 2014; Slocum *et al.* 2011). As baixas concentrações basais do Nrf2 são resultantes da síntese *de novo* e do processo de degradação proteossomal, o qual ocorre através da ubiquitinação (Slocum *et al.* 2011; Leonard *et al.* 2006; Reisman *et al.* 2009; Ke *et al.* 2013). Em condições basais, a proteína Nrf2 apresenta um tempo de meia vida de 10 a 30 minutos (Reisman *et al.* 2009).

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do Nrf2 em resposta a diferentes estressores, incluindo os eletrófilos, EROs e ERNs, tem sido alvo de diversos estudos (Ge *et al.* 2013; Leonard *et al.* 2006; Siegel *et al.* 2004). A proteína Keap1 apresenta domínios ricos de cisteína e tióis passíveis de sofrer oxidação pela interação direta com as EROs ou ERNs. Quando as células são expostas a esses agentes oxidantes, a ligação entre o Nrf2 e a proteína Keap1 é quebrada, devido a modificações químicas de alguns resíduos de cisteína, ocasionando o acúmulo do Nrf2 no citosol e a sua translocação para o núcleo (Morales *et al.* 2014; Slocum *et al.* 2011; Leonard *et al.* 2006). Quando presente no núcleo, o Nrf2 heterodimeriza com a proteína sMaf (do inglês, *small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) promovendo a interação com o ARE, assim determinando a transcrição de um conjunto de genes envolvidos na proteção celular, tais como NQO1, HO-1 e GST (Figura 7) (Shokeir *et al.* 2013; Slocum *et al.* 2011; Tanaka *et al.* 2007; Ke *et al.* 2013).

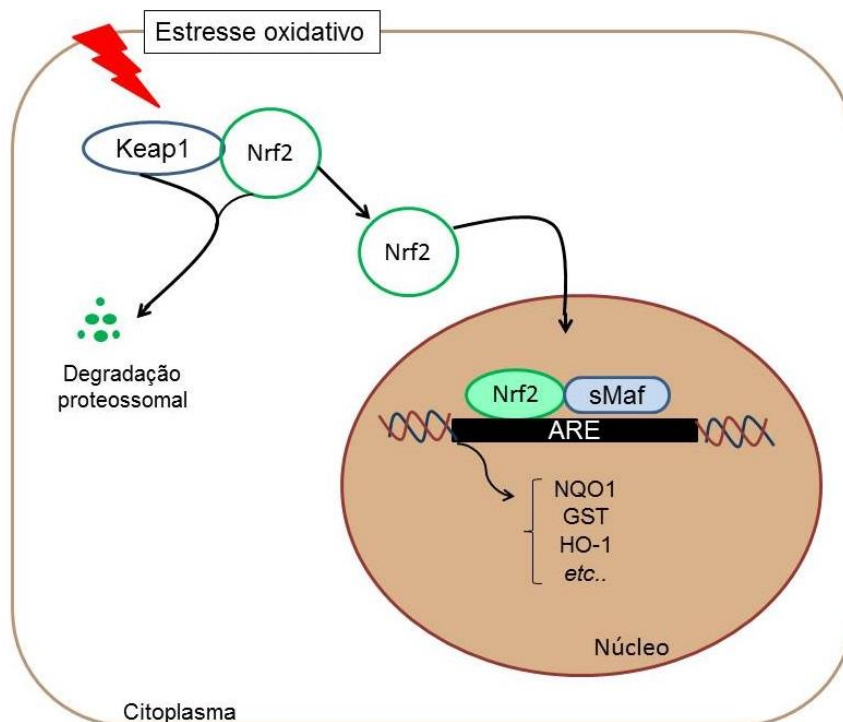


Figura 7 - Via de sinalização do Nrf2 na regulação da resposta antioxidante.

Abreviaturas - ARE: *antioxidant responsive element*; GST: glutationa S-transferase; HO-1: heme oxigenase-1; Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*; NQO1: *NAD(P)H quinone oxidoreductase-1*; Nrf2: *nuclear erythroid 2-related factor 2*; sMaf: *small musculoaponeurotic fibrosarcoma*.

Shokeir *et al.* (2014) estudaram em modelo experimental a expressão do Nrf2 e das enzimas HO-1 e NQO-1 na lesão de I/R renal, utilizando as técnicas de PCI e pós-condicionamento isquêmico. Demonstraram que os animais submetidos à técnica de PCI apresentaram maior ativação do Nrf2, o qual promoveu a transcrição dos genes HO-1 e NQO1, que atuam diminuindo o estresse oxidativo e modulando a resposta inflamatória. O pós-condicionamento isquêmico não apresentou estes efeitos protetores. A ativação do Nrf2 através da heterodimerização com ARE na resposta inflamatória tem sido considerada benéfica, atenuando o processo inflamatório e o dano celular (Chen *et al.* 2004, Li *et al.* 2008).

2.8 Técnicas de Proteção na Lesão de Isquemia e Reperusão

A preservação e o controle do sangramento durante a realização de hepatectomias pela oclusão total do pedículo hepático ou pela exclusão vascular do fígado são técnicas muito utilizadas (Pringle 1908; Heaney *et al.* 1966). Entretanto, no intuito de minimizar os efeitos deletérios ocasionados pela lesão de I/R, algumas modificações foram introduzidas nestes procedimentos, sendo estas alterações denominadas de oclusão intermitente do pedículo hepático, PCI ou Pós-condicionamento isquêmico (Zhu *et al.* 2013; Knudsen *et al.* 2013; Shokeir *et al.* 2013). A aplicação de hipotermia e o uso de drogas, entre elas cloreto de gadolínio, alopurinol e moléculas antioxidantes, também estão sendo relatadas como eficazes no sentido de prevenir ou atenuar as lesões causadas pelo processo de I/R (Kireev *et al.* 2012; Henry *et al.* 2012; Ellett *et al.* 2010).

2.8.1 Hipotermia

As primeiras descrições do uso de hipotermia em cirurgia hepática datam de 1953, quando Raffucci *et al.* demonstraram em modelo experimental que cães submetidos à isquemia hepática total, sob hipotermia, toleravam os efeitos da interrupção do fluxo sanguíneo aferente, por cerca de uma hora sem mortalidade, diferente do observado nos animais não submetidos a hipotermia. Esta observação foi confirmada por Bernhard *et al.* (1955), quando demonstraram que a diminuição da temperatura corporal para 30°C pode prolongar de forma segura o tempo de isquemia. Na prática cirúrgica, em 1961 Longmire *et al.* descreveram a primeira hepatectomia direita bem sucedida, utilizando hipotermia corporal a 32°C.

A isquemia hipotérmica ocorre nas situações em que, juntamente com a interrupção do fluxo sanguíneo para o órgão, se realiza o resfriamento do parênquima hepático. É um método empregado na preservação de órgãos para o transplante e durante a realização de ressecções hepáticas (Henry *et al.* 2012; Kato *et al.* 2002). Na literatura, várias técnicas para a aplicação de hipotermia estão descritas, tais como resfriamento corporal total, resfriamento por contato e perfusão hipotérmica *in situ* (Azoulay *et al.* 2005; Henry *et al.* 2012; Yamanaka *et al.* 1998). A hipotermia tópica (HT), técnica no qual se utiliza soluções semicongeladas sobre o fígado, vem sendo difundida, pela facilidade de realização, baixo custo e por ser pouco invasiva (Yamanaka *et al.* 1998). Yamanaka *et al.* (1997) realizaram um estudo em pacientes com carcinoma hepatocelular e hepatopatias crônicas que foram submetidos a segmentectomias, em normotermia ou utilizando HT, com temperatura entre 20°C e 25°C. Esses pesquisadores demonstraram que os pacientes submetidos à HT apresentaram redução da perda sanguínea e toleraram um tempo de isquemia prolongado por até 90 minutos, em comparação com os pacientes submetidos ao procedimento em normotermia.

O princípio pelo qual a hipotermia exerce o seu efeito protetor está baseado na redução do metabolismo enzimático de 1,5 a 2 vezes a cada redução de 10°C na temperatura tecidual (Belzer *et al.* 1988). Horvath *et al.* (1953) sugeriram que o consumo de oxigênio diminui exponencialmente quando aplicada a técnica de hipotermia, demonstrando uma redução no metabolismo do oxigênio de 50% quando a temperatura corporal estiver a 28°C e quando essa temperatura atingir 18°C a redução passa a 78%.

Devido à queda nas taxas metabólicas promovidas pelo uso de hipotermia, sua aplicação tem sido considerada efetiva na proteção dos órgãos sujeitos à hipóxia (Kato *et al.* 2002; Behrends *et al.* 2006). Estudos têm sugerido que o uso de hipotermia reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, atenua a agregação neutrofílica e a produção de RLs (Behrends *et al.* 2006; Henry *et al.* 2012; Grezzana Filho *et al.* 2011). Entretanto, a hipotermia também pode desencadear efeitos negativos, que incluem edema celular, pela inibição da Na⁺/K⁺-ATPase, acúmulo de lactato, acidose intracelular e produção de EROs (Selzner *et al.* 2003; Han *et al.* 2012).

2.8.2 Pré-Condicionamento Isquêmico

O PCI consiste na aplicação de um pequeno período de isquemia seguido por um curto intervalo de reperfusão, antes de submeter o órgão a um segundo período de isquemia mais prologando (Jaeschke *et al.* 2012; Min *et al.* 2011; Alchera *et al.* 2010). Este termo foi introduzido na literatura no final dos anos oitenta por Murry *et al.* (1986). Neste primeiro relato, foi descrito que breves períodos de isquemia miocárdica em cães poderiam resultar em resistência do músculo cardíaco, protegendo o tecido do período subsequente de I/R. Neste estudo foi constatando uma redução de 75% da área de infarto do miocárdio nos animais submetidos ao PCI quando comparados ao grupo controle. Após esse primeiro relato, os efeitos benéficos da aplicação do PCI foram demonstrados em outros órgãos, tais como rins, pulmões, intestino, fígado e cérebro (Thomaz Neto *et al.* 2013; Shokeir *et al.* 2013; Clavien *et al.* 2003; Golpich *et al.* 2014).

A técnica de PCI apresenta efeito protetor em dois momentos distintos: na fase precoce, oferecendo proteção nas primeiras 3 horas de reperfusão do órgão e na fase tardia, compreendida entre 12-24 horas. Nessa última etapa o estímulo protetor pode persistir por 2 a 3 dias (Figura 8) (Bolli 2000; Pasupathy *et al.* 2005; Ajamieh *et al.* 2008). Portanto, o PCI induz uma proteção bifásica contra a lesão de I/R: o estímulo inicial de proteção é mais forte em comparação com o fenômeno tardio, porém esse é mais prolongado (Pasupathy *et al.* 2005).

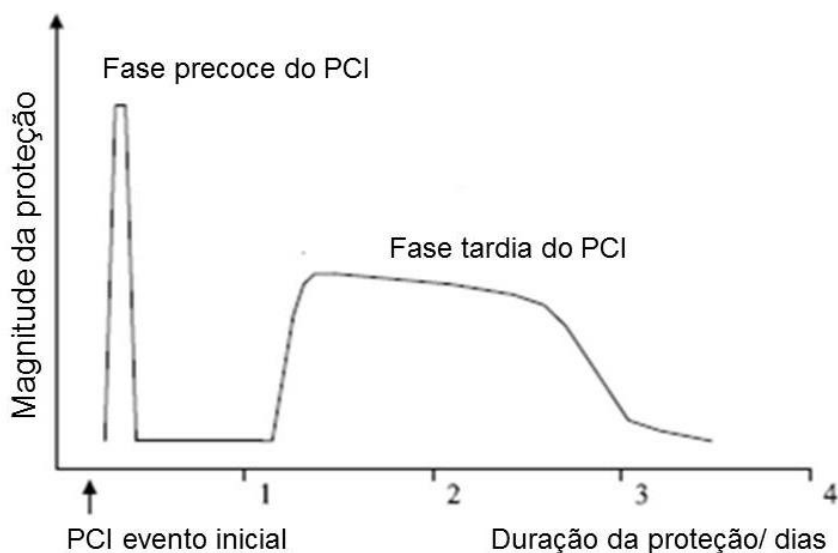


Figura 8 - Proteção bifásica induzida por um período de pré-condicionamento isquêmico. Abreviatura- PCI: pré-condicionamento isquêmico. Fonte: adaptado de Pasupathy *et al.* 2005.

O mecanismo pelo qual a técnica de PCI exerce o seu efeito protetor não está elucidado, mas esse benefício está relacionado à ativação de fatores intrínsecos de defesa, decorrentes da exposição prévia ao curto período de isquemia. A adenosina, subproduto da degradação do ATP, tem sido considerada a principal responsável por disparar o gatilho de proteção exercido pelo PCI (Ajamieh *et al.* 2008; Peralta *et al.* 1999; Alchera *et al.* 2010). A adenosina é liberada no espaço extracelular

segundos após o início da isquemia e demonstra propriedades inibitórias sobre o metabolismo oxidativo e a adesão dos neutrófilos às CES, aumentando a estabilidade da membrana celular e reduzindo o influxo de Ca^{+2} para o interior das células. Nilsson *et al.* (2000) investigaram o papel da adenosina em um modelo experimental de PCI que consistiu na aplicação de 10 minutos de isquemia e 15 minutos de reperfusão, antes do período subsequente de I/R hepática de 60 minutos. Esses pesquisadores demonstraram que o bloqueio do receptor da adenosina, utilizando 8-fenilteofilina, impediu que o PCI exercesse o seu efeito protetor. Outros estudos têm sugerido a participação do NO no mecanismo benéfico do PCI, por promover a inibição da síntese de ET-1 e regular a liberação de adenosina pelas CES (Peralta *et al.* 1997; Alchera *et al.* 2010; Serracino-Inglott *et al.* 2002).

O primeiro estudo clínico, demonstrando os efeitos protetores do PCI, foi conduzido por Clavien *et al.* (2000). Nesse estudo foram realizadas hepatectomias em 12 indivíduos associando a técnica de PCI, sendo comparado esse grupo com o de outros 12 indivíduos submetidos ao mesmo procedimento, porém sem o PCI. Os autores concluíram que o PCI é um método simples e efetivo na proteção do fígado, contra períodos prolongados de isquemia. Posteriormente, esses mesmos autores relataram o uso do PCI, que consistiu na aplicação de 10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão, em 50 indivíduos submetidos a ressecções hepáticas, comparando a indivíduos submetidos ao procedimento sem a aplicação de PCI. Nesse estudo os níveis das transaminases hepáticas foram menores nos indivíduos com idade inferior a 60 anos submetidos ao PCI. Na análise por regressão multivariada foi demonstrada uma proteção inversamente proporcional à idade, não

sendo comprovados os efeitos protetores do uso do PCI em pacientes com mais de 70 anos. Os autores concluíram que o PCI foi eficaz contra a lesão de I/R hepática, sendo efetivo em pacientes jovens que necessitem de um tempo prolongado de oclusão do fluxo sanguíneo (Clavien et al. 2003).

Apesar da grande maioria dos estudos demonstrarem evidências a favor da utilização do PCI contra a lesão de I/R no fígado, existem trabalhos demonstrando que o emprego dessa técnica ocasiona apenas um benefício limitado, ou é ineficaz (Schulz *et al.* 2001; Gurusamy *et al.* 2008; Azoulay *et al.* 2006). Schulz *et al.* (2001) utilizaram um protocolo experimental de PCI, com a aplicação de 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusão, antes do período subsequente de 120 minutos de isquemia hepática. Esses autores demonstraram que o grupo submetido ao PCI obteve recuperação do fluxo biliar e da síntese de ATP no período de reperfusão, contudo o grau de apoptose e necrose não diferiu em relação ao grupo controle. Com o aumento do período de isquemia para 200 minutos o grupo PCI não demonstrou diferença em relação ao grupo controle no que diz respeito ao nível das transaminases e a produção de bile e, além disso, o grupo PCI apresentou maior grau de apoptose e necrose celular. Ye *et al.* (2014) realizaram um estudo clínico randomizado com o objetivo de comparar os efeitos protetores das técnicas de PCI e exclusão vascular total na lesão de I/R em pacientes submetidos à hepatectomia. Esses autores concluíram que as duas técnicas foram similares e recomendaram o uso da exclusão vascular total, por ser um procedimento eficaz e melhor estabelecido. Outro estudo realizado avaliou 60 indivíduos que foram submetidos ou não ao PCI de 10 minutos, antes da realização da hepatectomia, sendo demonstrado que a utilização do PCI não protegeu o fígado da lesão de I/R,

não melhorando a função hepática e as taxas de morbimortalidade (Azoulay *et al.* 2006).

2.8.3 Hipotermia Tópica Associada ao Pré-condicionamento

Isquêmico

Na literatura existem relatos em modelos experimentais do uso associado das técnicas de HT e PCI, na retina e coração (Salido *et al.* 2013; An *et al.* 2005; Khaliulin *et al.* 2011). A avaliação dos efeitos protetores da combinação destas técnicas nunca foi realizada no fígado do ponto de vista dos marcadores antioxidantes e inflamatórios.

O único relato na literatura dessa associação em relação ao fígado foi realizado por Grezzana Filho *et al.* (2011) em ratos. Esses autores demonstraram que durante os 90 minutos de isquemia, os grupos experimentais em estudo, com exceção do grupo *sham*, apresentaram uma importante redução no fluxo biliar. No período de reperfusão do órgão, os animais submetidos à HT, de forma isolada ou associada ao PCI, apresentaram uma recuperação completa do fluxo biliar, após 45 minutos de reperfusão, diferentemente do grupo submetido somente ao PCI, o qual não recuperou o fluxo biliar. Os grupos HT e a HT+PCI mostraram-se eficazes na redução dos danos na fase precoce de I/R, restando dúvidas sobre o efeito protetor da técnica de PCI. Para a realização do presente estudo utilizamos materiais biológicos provenientes do trabalho de Grezzana Filho *et al.* (2011) para a realização das análises moleculares, visando avaliar os mecanismos inflamatório e antioxidantes da segunda linha de defesa na lesão inicial de I/R.

3. JUSTIFICATIVA

A isquemia inicia um conjunto de distúrbios circulatórios e metabólicos que causam a disfunção celular, podendo progredir para a morte celular. A restauração do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico é necessária para a remoção de metabólitos tóxicos e mediadores inflamatórios formados neste período, porém a reperfusão pode ser considerada tão ou mais deletéria para o tecido quanto à própria isquemia.

Algumas estratégias têm sido utilizadas para diminuir os danos ocasionados pelo período de I/R no fígado. A utilização de forma isolada ou associada das técnicas de HT e PCI pode proteger o tecido, provocando uma diminuição dos danos celulares ocasionados neste período.

Grezzana Filho *et al.* (2011) realizaram o primeiro relato do uso associado das técnicas de HT e PCI na lesão inicial de I/R no fígado, avaliando os danos hepáticos, fluxo biliar e enzimas antioxidantes da primeira linha de defesa contra os RLs. A aplicação da HT mostrou-se eficaz na redução dos danos na fase precoce de I/R, restando dúvidas sobre a existência de um efeito protetor adicional na associação da técnica de HT e PCI. Portanto no presente estudo, damos continuidade ao trabalho desenvolvido por Grezzana Filho *et al.* (2011), avaliando por meio de análises moleculares os mecanismos inflamatórios e antioxidantes de segunda linha de defesa na lesão inicial de I/R no fígado, marcadores ainda não testados nesta situação.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

O emprego das técnicas HT e PCI de forma isolada ou associada promove a diminuição do processo inflamatório, tornando prescindível a ativação do sistema antioxidante de segunda linha de defesa na lesão de I/R hepática em ratos?

5. HIPÓTESE

A utilização de forma isolada ou associada das técnicas de HT e PCI fornece proteção ao tecido hepático contra a lesão precoce de I/R em ratos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos inflamatórios e antioxidantes na lesão inicial de I/R hepática em ratos em relação à utilização das técnicas de HT e PCI de forma isolada ou simultânea.

6.2 Objetivos Específicos

– Quantificar as interleucinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p70 e a interleucina anti-inflamatória IL-10, no tecido hepático de ratos submetidos à I/R e sujeito ou não as diferentes técnicas de proteção tecidual.

– Avaliar a expressão proteica da eNOS e iNOS no tecido hepático dos diferentes grupos em estudo.

– Avaliar a expressão proteica da NQO1 no tecido hepático dos diferentes grupos em estudo.

– Avaliar a expressão citoplasmática do complexo Keap1 – Nrf2 no tecido hepático dos ratos em estudo.

– Determinar a expressão proteica do Nrf2, em extrato nuclear, do tecido hepático de ratos submetidos a I/R e sujeito ou não a diferentes técnicas de proteção tecidual.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, *et al.* The nitric oxide pathway--evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury. *Liver Int.* 2012. 32 (4):531-43.

Ajamieh HH, Candelario-Jalil E, Fernández OSL, *et al.* Ischaemic and pharmacological preconditionings protect liver via adenosine and redox status following hepatic ischaemia/reperfusion in rats. *Clin Sci (Lond).* 2008. 115 (2):69-77.

Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, *et al.* Molecular mechanisms of liver preconditioning. *World J Gastroenterol.* 2010. 16 (48):6058-67.

An J, Camara AK, Rhodes SS, *et al.* Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005. 288 (6):H2620-7.

Azoulay D, Eshkenazy R, Andreani 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.

Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, *et al.* Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg.* 2006. 202 (2):203-11.

Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, *et al.* Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int.* 2006. 26 (6):734-41.

Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988. 45 (4):673-6.

Ben Abdennebi H, Zaouali MA, Alfany-Fernandez I, *et al.* How to protect liver graft with nitric oxide. *World J Gastroenterol.* 2011. 17 (24):2879-89.

Bernhard WF, McMurrey JD, Curtis GW, *et al.* Feasibility of partial hepatic resection under hypothermia. *N Engl J Med.* 1955. 253 (5):159-64.

Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 2000. 87 (11):972-83.

Camargo CA, Madden JF, Gao W, *et al.* Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology.* 1997. 26 (6):1513-20.

Chattopadhyay P, Shukla G, Wahi AK. Protective effect of L-arginine against necrosis and apoptosis induced by experimental ischemic and reperfusion in rat liver. *Saudi J Gastroenterol.* 2009. 15 (3):156-62.

Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des.* 2004. 10 (8):879-91.

Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013. 328 (2):222-25.

Clarke CN, Kuboki S, Tevar A *et al.* CXC chemokines play a critical role in liver injury, recovery, and regeneration. *Am J Surg.* 2009. 198 (3):415-19.

Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HÁ, *et al.* A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg.* 2003. 238 (6):843-50.

Clavien PA, Yadav S, Sindram D, *et al.* Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000. 232 (2):155-62.

Cui LZ, Wang B, Chen LY, *et al.* The effect of ischemic precondition to IL-6 on rat liver ischemia-reperfusion injury in transplantation. *Asian Pac J Trop Med.* 2013. 6 (5):395-99.

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.

de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl.* 2009. 15 (10):1172-82.

Diao TJ, Chen X, Deng LH *et al.* Protective effect of nitric oxide on hepatopulmonary syndrome from ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2012. 18 (25):3310-16.

Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res.* 2010. 162 (1):95-109.

Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. *J Surg Res.* 2011. 167 (1):96-112.

Dinant S, Veteläinen RL, Florquin S, *et al.* IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *J Surg Res.* 2007. 141 (2):176-82.

Dixon E, Vollmer CM, Bathe OF, *et al.* Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg.* 2005. 190 (1):75-86.

Duran JA, González AA, García DD, *et al.* Variation in the levels of inflammatory cytokines depending on ischemic time: effects on respiratory variables. *Transplant Proc.* 2009. 41 (3):980-2.

Ellett JD, Atkinson C, Evans ZP, *et al.* Murine Kupffer cells are protective in total hepatic ischemia/reperfusion injury with bowel congestion through IL-10. *J Immunol.* 2010. 184 (10):5849-58.

Ernster L, Navazio F. Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chem. Scand.* 1958. 12:595-602.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989. 170 (6):2081-95.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980. 288 (5789):373-6.

Gang GT, Hwang JH, Kim YH, *et al.* Protection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Free Radic Biol Med.* 2014. 67:139-49.

Ge M, Chi X, Zhang A, *et al.* Intestinal NF-E2-related factor-2 expression and antioxidant activity changes in rats undergoing orthotopic liver autotransplantation. *Oncol Lett.* 2013. 6 (5):1307-12.

Gerschman R, Gilbert DL, NYE SW, *et al.* Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 1954. 119 (3097):623-6.

Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, *et al.* The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl.* 2005. 11 (9):1031-47.

Golpich M, Rahmani B, Mohamed Ibrahim N, *et al.* Preconditioning as a Potential Strategy for the Prevention of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 2014.

Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, *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.

Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, *et al.* Ischaemic preconditioning for liver transplantation. *Cochrane Database Syst Ver.* 2008. (1):CD006315.

Han HS, Park J, Kim JH *et al.* Molecular and cellular pathways as a target of therapeutic hypothermia: pharmacological aspect. *Curr Neuropharmacol.* 2012. 10 (1):80-7.

Heaney JP, Stanton WK, Halbert DS, *et al.* An improved technic for vascular isolation of the liver: experimental study and case reports. *Ann Surg.* 1966. 163 (2):237-41.

Henry SD, Nachber E, Tulipan J, *et al.* Hypothermic machine preservation reduces molecular markers of ischemia/reperfusion injury in human liver transplantation. *Am J Transplant.* 2012. 12 (9):2477-86.

Hines IN, Grisham MB. Divergent roles of superoxide and nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr.* 2011. 48 (1):50-6.

Hoekstra LT, van Trigt JD, Reiniers MJ, *et al.* Vascular occlusion or not during liver resection: the continuing story. *Dig Surg.* 2012. 29 (1):35-42.

Horvath SM, Hutt BK, Spurr GB, *et al.* Some metabolic responses of dogs having low body temperature. *Science.* 1953. 118 (3056):100-1.

Hsu CC, Wang JJ. L-ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuates liver ischemia-reperfusion induced of cardiac function impairment. *Transplant Proc.* 2012. 44 (4):933-6.

Hur GM, Ryu YS, Yun HY, *et al.* Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 261 (3):917-22.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987. 84 (24):9265-9.

Ildelfonso JA, Arias-Díaz J. Pathophysiology of liver ischemia-reperfusion injury. *Cir Esp*. 2010. 87 (4):202-9.

Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006. 290 (6):G1083-8.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990. 4 (15):3355-9.

Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012. 26 (2):103-14.

Kato A, Singh S, McLeish KR, *et al*. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002. 282 (4):G608-16.

Ke B, Shen XD, Zhang Y, *et al*. KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants. *J Hepatol*. 2013. 59 (6):1200-1207.

Khaliulin I, Halestrap AP, Suleiman MS. Temperature preconditioning is optimal at 26° C and confers additional protection to hypothermic cardioplegic ischemic arrest. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011. 236 (6):736-45.

Kireev RA, Cuesta S, Ibarrola C, *et al*. Age-related differences in hepatic ischemia/reperfusion: gene activation, liver injury, and protective effect of melatonin. *J Surg Res*. 2012. 178 (2):922-34.

Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am*. 2010. 90 (4):665-77.

Knudsen AR, Kannerup AS, Grønbæk H, *et al*. Quantitative histological assessment of hepatic ischemia-reperfusion injuries following ischemic pre- and post-conditioning in the rat liver. *J Surg Res*. 2013. 180 (1):e11-20.

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, *et al*. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989. 170 (3):827-45.

Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, *et al.* Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology*. 1999. 30 (6):1448-53.

Leonard MO, Kieran NE, Howell K, *et al.* Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2006. 20 (14):2624-6.

Li W, Khor TO, Xu C, *et al.* Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2008. 76 (11):1485-9.

Longmire WP, Marable SA. Clinical experiences with major hepatic resections. *Ann Surg*. 1961. 154:460-74.

Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012. 385 (5):465-71.

Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, *et al.* Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery*. 2006. 140 (5):793-802.

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985. 312 (3):159-163.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969. 244 (22):6049-55.

Min SO, Kim SH, Lee SW, *et al.* The effect of preconditioning on liver regeneration after hepatic resection in cirrhotic rats. *Korean J Hepatol*. 2011. 17 (2):139-147.

Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, *et al.* Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2008. 147 (1):153-9.

Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, *et al.* Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. 1990. 248 (4960):1230-4.

Morales P, Vargas R, Videla LA, *et al.* Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol. *Food Funct.* 2014. 5 (2):243-50.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986. 74 (5):1124-36.

Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, *et al.* Global Consequences of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2014. 2014:906965.

Nilsson B, Friman S, Wallin M, *et al.* The liver protective effect of ischemic preconditioning may be mediated by adenosine. *Transpl Int.* 2000. 13 Suppl 1:S558-61.

Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. 158 (1):348-52.

Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005. 29 (2):106-15.

Patel RP, Lang JD, Smith AB *et al.* Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Hepatol.* 2014. 6 (1):1-8.

Peralta C, Fernández L, Panés J, *et al.* Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001. 33 (1):100-13.

Peralta C, Hotter G, Closa D, *et al.* Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 1997. 25 (4):934-7.

Peralta C, Hotter G, Closa D, *et al.* The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999. 29 (1):126-32.

Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, *et al.* Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2009. 22 (1):46-55.

Pinheiro BV, Holanda MA, Araújo FG *et al.* Lesão pulmonar de reperfusão. *Jornal de Pneumologia.* 1999. 25:124-36.

Pringle JH. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg.* 1908. 48 (4):541-9.

Raffucci FL. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. *Surgery.* 1953. 33 (3):342-51.

Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, *et al.* Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci.* 2009. 108 (1):35-47.

Salido EM, Dorfman D, Bordone M, *et al.* Global and ocular hypothermic preconditioning protect the rat retina from ischemic damage. *PLoS One.* 2013. 8 (4):e61656.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010. 10 (3):170-81.

Schulz R, Walz MK, Behrends M, *et al.* Minimal protection of the liver by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001. 280 (1):H198-207.

Selzner N, Rudiger H, Graf R, *et al.* Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology.* 2003. 125 (3):917-36.

Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, *et al.* Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *BMC Gastroenterol.* 2002. 2:22.

Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, *et al.* Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation.* 1997. 63 (1):143-8.

Shokeir AA, Hussein AM, Barakat N, *et al.* Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and Nrf-2-dependent genes by ischaemic pre-conditioning and post-conditioning: new adaptive endogenous protective responses against renal ischaemia/reperfusion injury. *Acta Physiol (Oxf).* 2013. 210 (2): 342-53.

Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, *et al.* NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol.* 2004. 65 (5):1238-47.

Siriussawakul A, Zaky A, Lang JD. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2010. 16 (48):6079-86.

Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol*. 2011. 85 (4):273-84.

Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res*. 1994. 57 (2):253-8.

Taha MO, Caricati-Neto A, Ferreira RM, *et al*. L-arginine in the ischemic phase protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2012. 27 (9):616-23.

Taki-Eldin A, Zhou L, Xie HY, *et al*. Triiodothyronine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in a partial hepatectomy model through inhibition of proinflammatory cytokines, transcription factors, and adhesion molecules. *J Surg Res*. 2012. 178 (2):646-56.

Tanaka Y, Maher JM, Chen C, *et al*. Hepatic ischemia-reperfusion induces renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice. *Mol Pharmacol*. 2007. 71 (3):817-25.

Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol*. 1935. 112:351-61.

Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011. 26 Suppl 1:180-7.

Thomaz Neto FJ, Koike MK, Abrahão MS, *et al*. Ischemic preconditioning attenuates remote pulmonary inflammatory infiltration of diabetic rats with an intestinal and hepatic ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2013. 28 (3):174-8.

Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg*. 1975. 129 (5):513-7.

Uysal AI, Ocmen E, Akan M, *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. 2014:892704.

van Gulik TM, de Graaf W, Dinant S, *et al*. Vascular occlusion techniques during liver resection. *Dig Surg*. 2007. 24 (4):274-81.

Wanner GA, Ertel W, Müller P, *et al*. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock*. 1996. 5 (1):34-40.

Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, *et al.* Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB Surg.* 2012. 2012:176723.

Yamanaka N, Dai CL, Okamoto E. Historical evolution of hypothermic liver surgery. *World J Surg.* 1998. 22 (10):1104-7.

Yamanaka N, Furukawa K, Tanaka T, *et al.* Topical cooling-assisted hepatic segmentectomy for cirrhotic liver with hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg.* 1997. 184 (3):290-6.

Ye B, Zhao H, Hou H, *et al.* Ischemic preconditioning provides no additive clinical value in liver resection of cirrhotic and non-cirrhotic patients under portal triad clamping: A prospective randomized controlled trial. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014.

Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2006. 45 (5):268-76.

Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, *et al.* Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology.* 1999. 30 (1):203-8.

Zhu Y, Dong J, Wang WL, *et al.* Ischemic preconditioning versus intermittent clamping of portal triad in liver resection: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Hepatol Res.* 2013. 44 (8):878-87.

8. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Title of the paper- Topical hypothermia is more effective than ischemic preconditioning to prevent early hepatic ischemia/reperfusion injury

Authors names- Larisse Longo,^{1,2} Leila Xavier Sinigaglia Fratta,^{1,2} Giovana Regina Weber,^{1,2} Andrea Janz Moreira,¹ Néelson Alexandre Kretzmann,³ Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho,⁴ Norma Possa Marroni,¹ Carlos Otávio Corso,⁴ Themis Reverbel da Silveira,^{1,2} Mário Reis Álvares-da-Silva,^{2,5} Jorge Luiz dos Santos^{1,2,6}

Affiliation

1. Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

2. Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

3. Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

4. Surgery Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

5. Gastroenterology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

6. Pediatric Hepatology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

Address for correspondence

Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350/ sala 12214. CEP 90035-003, Bairro Rio Branco, Porto Alegre, RS – Brazil

Corresponding author

Larisse Longo

Phone: +55-51-3359.8847; Fax number- +55-51-3359.8760

E-mail – larisselongo@hotmail.com

Short running title: Prevention of ischemia/reperfusion injury

ABSTRACT

Objective: To compare the efficacy of the isolated or combined use of topical hypothermia (TH) and ischemic preconditioning (IPC) in a rat model of early ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods:** Wistar rats underwent 70% liver ischemia for 90 minutes followed by 120 minutes of reperfusion. Livers of animals allocated in the sham, normothermic ischemia (NI), IPC, TH, and TH+IPC groups were collected for molecular analyses by ELISA and Western blot, aiming to compare proinflammatory, anti-inflammatory, and antioxidant profiles. **Results:** Compared with NI, TH presented decreased tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-12 concentrations and increased IL-10 levels. TH animals displayed lower inducible nitric oxide synthase (iNOS) and higher endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expressions. NAD(P)H-quinone oxidoreductase-1(NQO1) expression was also lower with TH. Isolated IPC and NI were similar regarding all these markers. TH+IPC was associated with decreased IL-12 concentration and reduced iNOS and NQO1 expressions, similarly to isolated TH. Expression of Kelch-like ECH-associated protein (Keap)-1 was increased and expression of nuclear and cytosolic nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) was decreased with TH+IPC vs. NI. **Conclusion:** TH was the most effective method of protection against early I/R injury. Isolated IPC entailed triggering of second-line antioxidant defense enzymes. Combined TH+IPC seemed to confer no additional advantage over isolated TH in relation to the inflammatory process, but had the advantage of completely avoid second-line antioxidant defense enzymes.

Keywords: hypothermia, induced; ischemia/reperfusion; ischemic preconditioning; liver; pathophysiology.

INTRODUCTION

The reversibility of ischemia-related liver dysfunction depends on the cause, intensity, and duration of the ischemic process.^{1,2} Paradoxically, even though reperfusion is essential for protecting the liver against irreversible dysfunction, it is exactly during this process that most liver injury occurs.^{3,4} Hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury results from normothermic ischemia (NI) associated with surgical and clinical scenarios such as liver resection, vascular procedures, or hypovolemic shock. In liver transplantation, in which the liver is submitted to both NI and hypothermic ischemia (during storage in a preservation solution), I/R injury accounts for 10%-30% of primary graft dysfunction.^{2,4,5}

Various mechanisms play a role in I/R.^{2,4,6} During reperfusion, endothelial cell edema, vasoconstriction, leucocyte adhesion, and platelet aggregation in hepatic sinusoids cause an uneven decrease in microvascular blood flow, producing scattered hypoxic regions.^{2,4} Kupffer cells (KC) and neutrophils are thus activated and secrete inflammatory mediators and reactive oxygen species (ROS), increasing tissue damage.^{7,8} Inflammatory mediators related to I/R include, among several others, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-12, while IL-10 acts as an anti-inflammatory cytokine.^{3,8,9} Nitric oxide (NO), in addition to inducing vasodilation, produces reactive nitrogen species (RNS), contributing to oxidative stress.^{10,11} An imbalance between endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) promotes I/R injury.¹⁰⁻¹² If I/R injury is not soon halted, the liver will unleash the production of second-line antioxidant enzymes, including NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1), by regulating signaling molecules such as the nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2).¹³⁻¹⁶ Activated Nrf2

is uncoupled from a cytosolic complex with Kelch-like ECH-associated protein (Keap)-1, and translocates to the nucleus, in order to affect I/R.^{6,15,17}

Some therapeutic measures have been developed with the aim of protecting the liver from I/R injury, such as induction of topical hypothermia (TH) and ischemic preconditioning (IPC), which consists in the use of brief periods of ischemia interspersed with reperfusion intervals.¹⁸⁻²¹

Our group has previously evaluated the efficacy of TH in isolation or associated with IPC (TH+IPC) to ameliorate early stage I/R injury in rats submitted to 90-minute 70% liver ischemia followed by 120-minute reperfusion.²² In that study, all animals presented bile flow blockade during ischemia; however, bile flow was completely restored at 45 minutes of reperfusion in the groups submitted to TH alone and TH+IPC, but not in the animals submitted to isolated IPC or maintained in NI. This suggests that TH itself might ameliorate the I/R injury, with the possibility of an additive protective role IPC when the two measures were combined. The present study aimed to evaluate the behavior of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as oxidative stress and second-line antioxidant markers, in livers of the animals analyzed in that previous experiment, helping to define at the molecular level the mode of action and efficacy of each protective method.²²

METHODS

Surgical procedure

This study evaluated liver samples obtained following euthanasia from animals (n=32) submitted to I/R injury by Grezzana Filho et al.²² Male Wistar rats, weighing between 200-250 grams, underwent a 90-minute 70% liver ischemia, including left

and median lobes by clamping the hepatic artery and the portal vein and preserving the patency of bile ducts, followed by 120 minutes of reperfusion. Five groups were studied: sham (n=4), NI (n=7), IPC (n=7), TH (n=7), and TH+IPC (n=7). IPC consisted of consecutive 10-minute periods of ischemia and reperfusion before the ischemic insult. TH was induced by the superfusion of cooled saline at 26°C onto the ischemic lobes. Bile flow was recorded every 15 minutes. All animals were euthanized immediately after the end of the experiment. Samples of lobes previously ischemic were immediately stored in liquid nitrogen and kept at -80°C.

Protein concentration assessment

Protein concentration in tissue homogenates was assessed in accordance with the technique described by Bradford.²³ Samples were analyzed by spectrophotometry at 595 nm and the obtained values were expressed in mg/mL. These values were employed for the calculations of ELISA and Western blot assays. For each method, specific homogenates were prepared.

Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)

ELISA was used to assess concentrations of IL-1 β (eBioscience 88-6010, San Diego, CA, USA), TNF- α (eBioscience 88-7340, San Diego, CA, USA), IL-6 (BioSource KRC0061, Camarillo, CA, USA), IL-12p70 (BioSource KRC2371, Camarillo, CA, USA), and IL-10 (BioSource KRC0102, Camarillo, CA, USA).

The liver tissue samples were homogenized in a PBS buffer containing a protease inhibitor mix/cocktail (Sigma P8340, Saint Louis, MO, USA) in ice and centrifuged at 4,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant was collected for determining the concentration of the studied markers.

All analyses were done according to manufacturer instructions. Absorbance was measured by a spectrophotometer at 450 nm. Color intensity was directly proportional to cytokine concentration in the samples. Results were expressed in pg/mg of protein.

Cytoplasm and nuclear extracts preparation

Cytoplasm extracts for determining eNOS, iNOS, Nrf2, Keap1 and NQO1 protein expressions, as well as nuclear extracts for ascertaining nuclear Nrf2 protein expressions, all by Western blot, were prepared from liver tissue fragments using a protocol adapted from Sadowiski & Gilman.²⁴ Briefly, liver samples were homogenized in ice with 500µL hypotonic buffer A (1M HEPES pH 7.9, 0.5M NaF, 100mM Na₃VO₄, 100mM glycerolphosphate Na, 0.5M EDTA-Na pH 7.5, 100mM EGTA pH 7.5 and 1mM DTT). Nonidet P-40 and protease inhibitor were added to this solution. Samples were centrifuged at 1,000 rpm during 10 minutes at 4°C. The supernatant was removed and stored at -80°C for Western blotting of the cytoplasmic extract. The nuclear pellet present in the liver sediment fraction was resuspended with 50µL of hypotonic buffer B (1M HEPES pH 7.9, 0.5M NaF, 100mM Na₃VO₄, 4M NaCl, 100mM glycerolphosphate Na, 0.5M EDTA-Na pH 7.5, 100mM EGTA pH 7.5 and 1mM DTT) and vortexed at 5-minute intervals during 30 minutes. Nuclear extracts were then centrifuged at 12,000 rpm during 20 minutes at 4°C and the supernatant was stored at -80°C until the accomplishment of the Western blot assay.

Western blot

Samples containing 100µg of protein were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (9%-12% acrylamide) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were then blocked with 5%

nonfat dry milk in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4°C with polyclonal anti-eNOS (SC8311/ 130kDa), anti-Keap1 (SC 33569/ 70kDa), anti-Nrf2 (SC30915/ 57kDa), monoclonal anti-iNOS (SC7271/ 120kDa), anti-NQO1 (SC376023/ 31kDa) and anti- β -actin (SC 8432/ 43kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200 - 1:1,000 dilution with PBS-T in 5% nonfat dry milk. After the membranes were washed with PBS-T and incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:5,000 - 1:10,000 dilution with PBS-T in 5% nonfat dry milk. Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (WBKLS0050 Millipore Co., Billerica, MA, USA) in L-Pix Chemi Molecular Imaging. The density of the specific bands was quantified with the program ImageJ and the results were expressed in arbitrary units (a.u.).

Statistics

Normality of data distribution was evaluated using the Shapiro-Wilk test. Because distributions were parametric in the comparison between groups, ANOVA was used followed by the Tukey post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, which follows the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) ethical code for animal experimentation.

RESULTS

In this study, the NI group represented the unprotected liver against I/R injury, while sham animals were employed as normal controls. Animals submitted to the protective methods IPC, TH and TH+IPC were compared with both these groups.

Effect of protective methods on inflammatory cytokine behavior

We sought to determine the effects of each protective method on early I/R injury in the liver reflected by the concentration of inflammatory molecules (Figure 1 A-D). Significant differences were observed among the groups for the concentrations of all inflammatory molecules evaluated: TNF- α ($P < 0.001$), IL-1 β ($P = 0.001$), IL-6 ($P < 0.001$), IL-12 ($P < 0.001$). The concentrations of all these molecules were decreased in the TH group in comparison to NI: TNF- α ($P < 0.001$), IL-1 β ($P = 0.005$), IL-6 ($P = 0.001$) and IL-12 ($P = 0.002$), with values similar to those of the sham group. The IPC and TH+IPC groups were similar to NI for TNF- α ($P = 0.416$ and $P = 0.873$, respectively), IL-1 β ($P = 0.659$ and $P = 0.419$ respectively), IL-6 ($P = 0.997$ and $P = 0.149$ respectively). IL-12 concentration was decreased in the TH+IPC group in comparison to the NI group ($P = 0.016$), with values comparable to the sham group, while the IPC group presented IL-12 concentrations similar to those of NI ($P = 0.411$).

Effect of protective methods on anti-inflammatory cytokine IL-10

We evaluated the role of anti-inflammatory cytokine IL-10 in the protection against I/R injury. Results are described in Figure 2. Liver concentrations of IL-10 were significantly different among the groups ($P < 0.001$), with the TH group presenting higher IL-10 concentrations vs. the NI group ($P = 0.015$). In the isolated IPC and TH+IPC groups, IL-10 levels were similar to those of the NI group ($P = 0.988$ and $P = 0.981$ respectively).

Effect of protective methods on nitric oxide synthase isoforms

In addition to inflammation markers, we investigated the expression of nitric oxide synthases with each protective method (Figure 3 A-C). eNOS expression differed significantly among the groups ($P=0.006$), with the TH group displaying higher expression in comparison with both the NI ($P=0.037$) and TH+IPC ($P=0.006$) groups. Regarding iNOS expression, significant differences were also observed among the groups ($P<0.001$). The sham group presented the lowest expression compared to NI ($P<0.001$), IPC ($P=0.013$), and TH+IPC ($P=0.029$), while TH and TH+IPC presented a lower expression in comparison with both NI ($P=0.001$ and $P<0.001$, respectively) and isolated IPC ($P=0.034$ and $P=0.013$ respectively).

Activation of the second-line antioxidant defenses by protective methods

We tried to identify which protective method activated second-line antioxidant defenses. For that, the expression of NQO1 protein and the behavior of the Keap1-Nrf2 complex, including cytosolic and nuclear Nrf2 expression, were analyzed (Figure 4 A-F). We observed differences among groups in the expression of NQO1 ($P=0.001$), Keap1 ($P=0.027$), and cytosolic ($P=0.006$) and nuclear ($P=0.005$) Nrf2. NQO1 expression was similar in the IPC and NI ($P=0.991$) groups, and was higher in both these groups as compared to the sham ($P=0.022$ and $P=0.042$, respectively), TH ($P=0.009$ and $P=0.020$, respectively) and TH+IPC ($P=0.010$ and $P=0.022$, respectively) groups. Keap1 protein expression in TH+IPC group was higher than in NI ($P=0.035$). The NI group displayed the highest cytosolic Nrf2 expression, with values similar to those observed in the isolated IPC group ($P=0.722$), and the highest nuclear Nrf2 expression, which was higher than that recorded in the sham ($P=0.004$) and TH+IPC ($P=0.029$) groups.

DISCUSSION

The mechanisms by which TH and IPC operate in I/R injury are not completely clear, but they are thought to play a crucial role in relieving inflammation and production of ROS and RNS following reperfusion.^{18,19,21,25} The association of TH+IPC has been used in cardiac and retinal surgeries.²⁶⁻²⁸ Regarding the liver, our group was the first to report on the effectiveness of this synergistic approach to prevent early I/R injury in a rat model.²² We analyzed the protective effect of isolated or combined TH and IPC on bile flow and on the behavior of first-line antioxidant enzymes, comparing these treatment groups with sham and NI groups. We observed that in animals submitted to TH and TH+IPC, bile flow was restored during reperfusion after bile flow blockade during ischemia. The present study was designed to continue that initial investigation. For that, we focused on the molecular mechanisms and effectiveness of TH and IPC methods used alone or in combination for protecting against hepatic I/R injury, considering pro- and anti-inflammatory molecules as well as markers associated with the second-line antioxidant defense.²²

Hepatic I/R injury can be classified into two stages in relation to reperfusion: an early phase, corresponding to the first 6 hours after the start of reperfusion, and a late phase that lasts 48 hours.^{5,12} In early I/R, activated KC secrete pro-inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, which intensify cell injury.^{3,7} In this study, the TH group showed decreased hepatic concentrations of TNF- α and IL-1 β in comparison with the NI group, and the concentration of these molecules in the TH group was similar to that found in sham animals.

In the presence of I/R injury, TNF- α and IL-1 β have similar activity, exerting a stimulatory effect on the expression of other inflammatory cytokines and chemokines,

regulating free radical production, and helping neutrophil recruitment and adhesion to sinusoidal endothelial cells.²⁹ The present findings agree with those obtained by other groups, showing that the use of hypothermia in hepatic I/R injury reduces inflammation by lowering TNF- α and IL-1 β production.^{18,29,30} Mahmoud et al. observed that inhibition of TNF- α induces decreased inflammation and oxidative stress, possibly providing a useful therapeutic approach to prevent I/R injury.⁸ In the present study, TNF- α and IL-1 β concentrations were similar in IPC and NI animals. Koneru et al. did not observe advantages in using IPC during surgical procedures to decrease TNF- α concentrations.³¹

In this study, hepatic IL-6 concentrations were decreased in TH and sham groups in comparison with NI, while in the IPC group IL-6 concentrations were not different from NI. IL-6 is an important marker of tissue damage and inflammation, and decreasing its expression minimizes I/R injury.³² The present findings suggest that TH, and not IPC, has a protective role against hepatic inflammation. Qi et al. using an animal model of hepatocellular carcinoma, reported that the use of IPC induced decreases in TNF- α and IL-1 β serum levels, associated with increased levels of IL-6 and higher signal transduction and activation of transcription 3 (STAT3) expression.¹⁸ They proposed that the beneficial effects of IPC might be cancelled out by the activation of the IL-6/STAT3 pathway, thus accelerating carcinogenesis. Other studies, however, propose that increased IL-6 concentrations lead to STAT3 activation, inducing the expression of mitogenic and anti-apoptotic proteins capable of protecting against I/R injury and contributing to hepatocellular regeneration.^{33,34}

In the present study, TH, alone or associated with IPC, led to diminished hepatic IL-12 concentration, with levels similar to those of the sham group. IL-12 is a

pro-inflammatory mediator involved in hepatic I/R injury, and animal models have revealed that exogenous application of this cytokine led to KC activation, expression of cell adhesion molecules, and neutrophil accumulation in liver parenchyma. Conversely, mice treated with neutralizing antibodies for IL-12 presented decreased TNF- α and interferon- γ expression, causing reduced neutrophil recruitment to liver parenchyma.^{9,35} In the present study, the IPC group presented the highest concentrations of IL-12, suggesting that IPC does not protect against the action of the pro-inflammatory mediators that worsen hepatic I/R injury.

In turn, IL-10 (previously called cytokine synthesis inhibitory factor) plays an important anti-inflammatory role against I/R injury.³⁶ In this study, not only was TH responsible for decreasing the concentration of inflammatory cytokines, it also caused increased secretion of IL-10 in comparison with the NI group. IL-10 levels were similar in livers of IPC and NI animals. This finding differs from the report by Serafín et al. who observed a protective effect of IPC in livers of animals with fatty liver disease, associated with increased levels of IL-10 and reduced inflammation.³⁷ Some studies have reported blocked nuclear factor- κ B activity as a result of IL-10 secretion in I/R injury, and thus the expression of inflammatory mediators, protecting liver against cell damage.^{3,7,38}

NO plays a key role in the regulation of liver blood flow in normal conditions, but the increased production of NO during I/R injury aggravates hepatic tissue damage owing to free radical production.^{10,12} NO is synthesized through the action of NOS. eNOS leads to the production of physiological amounts of NO, while iNOS prompts copious and lasting NO synthesis, thus explaining iNOS involvement in several pathologic conditions.^{10,11} The present study showed higher eNOS

expression in the TH group compared to NI. NO synthesis attributable to the action of eNOS has a protective effect against I/R injury, modulating vasodilation and inhibiting the production of inflammatory cytokines and free radicals by KC.^{12,39,40} In this study, higher iNOS expression was also observed in the IPC group as compared to the TH alone or TH+IPC group, but similar to the NI group. iNOS-derived NO may be toxic or protective, depending on the type of aggression, on NO levels, and on the duration of iNOS expression.^{4,11} Our findings indicate that TH provided protection against I/R injury in liver by promoting an increase in the levels of eNOS, while IPC, on the contrary, led to increased expression of iNOS, which may aggravate hepatocellular damage.

ROS and RNS are generated along the entire period of I/R injury, but the detrimental effect of oxidant agents associated with a decrease in antioxidant defenses produces oxidative stress.^{2,4} The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase are classified as first-line antioxidant defenses against I/R injury.⁴¹ Grezzana Filho et al.²² showed that TH induced increased levels of SOD in comparison with NI, IPC and TH+IPC. The increased levels of SOD induced by TH are capable of abolishing the damage caused by I/R injury, precluding the use of second-line antioxidant defenses.

Second-line antioxidant defense enzymes are activated whenever those in the first line fail.^{17,41} Second-line enzymes synthesis is mediated through activation of the Nrf2-antioxidant response element signaling pathway.^{6,13} In normal conditions, Nrf2 is located in cytoplasm, associated with its repressor Keap1, both forming an inactive complex. Under stress condition, inducers such as ROS oxidize Keap1 cysteine residue, leading to dissociation of the inhibitory complex.^{15,17} Nrf2 uncouples from

Keap1, and translocates to the nucleus in order to promote the gene transcription of second-line antioxidant enzymes, such as NQO1.¹³⁻¹⁵ However, during a short time span before entering the nucleus, activated Nrf2 accumulates in cytoplasm.¹⁷

In this study, TH was effective in controlling the generation of ROS, protecting against the cellular damage caused by reperfusion. The TH group had the lowest concentrations of inflammatory cytokines and the highest IL-10 levels, as well as a more favorable liver vasoactive response as assessed by iNOS and eNOS expression. These findings indicate lower production of ROS and RNS and an adequate restoration of the cell redox balance with TH. Reduced oxidative stress prevents damage to lipids, proteins, and DNA.^{2,16} Conversely, NQO1 expression was higher in the IPC group in comparison with the TH and TH+IPC groups, suggesting that IPC failed to control oxidative stress through first-line antioxidant defense enzymes. Shokeir et al. evaluated Nrf2 and NQO1 expressions in animals submitted to the IPC approach against renal I/R injury.¹³ The results obtained by those authors are similar to those of our study, with IPC animals presenting higher levels of Nrf2 and NQO1 expression in comparison with the unprotected sample. Some studies, however, report a synergic effect of NQO1 and SOD, which protects cells against the generation of ROS and RNS.^{16,42} In the present study, TH alone or in combination with IPC produced the lowest expression of Nrf2 in cytoplasm, indicating less Nrf2-Keap1 uncoupling and activation and suggesting that in this group activation of the second-line defense system was unnecessary. Isolated IPC, on the contrary, produced similar cytosolic Nrf2 expression to NI, indicating failure of the first antioxidant defense line. The combination of the two methods, TH and IPC, caused complete inhibition of Keap1/Nrf2 uncoupling, preventing translocation of Nrf2 to the

nucleus. This strong inhibition resulted in reduced expression of both NQO1 and nuclear Nrf2. These findings suggest that the association of IPC with TH may contribute an additional protective effect as compared to TH alone.

In conclusion, using an animal model of early I/R injury, we showed that TH alone was more effective than IPC alone to protect the liver against inflammation and oxidative stress, precluding the need to activate second-line antioxidant defenses. Isolated IPC did not have a protective effect as indicated by the markers evaluated in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Knudsen AR, Kannerup AS, Grønbæk H, et al. Quantitative histological assessment of hepatic ischemia-reperfusion injuries following ischemic pre- and post-conditioning in the rat liver. *J Surg Res* 2013; 180:e11-20.
2. Ildefonso JA, Arias-Díaz J. Pathophysiology of liver ischemia-reperfusion injury. *Cir Esp* 2010; 87:202-9.
3. Dinant S, Veteläinen RL, Florquin S, van Vliet AK, van Gulik TM. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *J Surg Res* 2007; 141:176-82.

4. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* 2005; 11:1031-47.
5. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection-the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26:180-7.
6. Ke B, Shen XD, Zhang Y, et al. KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants. *J Hepatol* 2013; 59:1200-7.
7. Kireev RA, Cuesta S, Ibarrola C, et al. Age-related differences in hepatic ischemia/reperfusion: gene activation, liver injury, and protective effect of melatonin. *J Surg Res* 2012; 178:922-34.
8. Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2012; 385:465-71.
9. Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, et al. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 1999; 30:1448-53.
10. Miyake T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Mizutani T, Imamura A, Nagino M. Endothelial nitric oxide synthase plays a main role in producing nitric oxide in the superacute phase of hepatic ischemia prior to the upregulation of inducible nitric oxide synthase. *J Surg Res* 2013; 183:742-51.

11. Tsuchihashi S, Kaldas F, Chida N, et al. FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6:2013-22.
12. Hines IN, Harada H, Flores S, Gao B, McCord JM, Grisham MB. Endothelial nitric oxide synthase protects the post-ischemic liver: potential interactions with superoxide. *Biomed Pharmacother* 2005; 59:183-9.
13. Shokeir AA, Hussein AM, Barakat N, Abdelaziz A, Elgarba M, Awadalla A. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and Nrf-2-dependent genes by ischaemic pre-conditioning and post-conditioning: new adaptive endogenous protective responses against renal ischaemia/reperfusion injury. *Acta Physiol (Oxf)* 2013; 210:342-53.
14. Kudoh K, Uchinami H, Yoshioka M, Seki E, Yamamoto Y. Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice. *Ann Surg* 2014; 260:118-27.
15. Leonard MO, Kieran NE, Howell K, et al. Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2006; 20:2624-6.
16. Gang GT, Hwang JH, Kim YH, et al. Protection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Free Radic Biol Med* 2014; 67:139-49.
17. Morales P, Vargas R, Videla LA, Fernández V. Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol. *Food Funct* 2014; 5:243-50.

18. Qi Q, Bie P. Different roles of hepatic hypothermic ischemia and ischemic preconditioning in chemically induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Surg Res* 2014; 189:213-21.
19. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int* 2006; 26:734-41.
20. Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003; 238:843-50.
21. Choi S, Noh J, Hirose R, et al. Mild hypothermia provides significant protection against ischemia/reperfusion injury in livers of obese and lean rats. *Ann Surg* 2005; 241:470-6.
22. Grezzana Filho TeJ, Mendonça TB, Gabiatti G, et al. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras* 2011;26:194-201.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
24. Sadowski HB, Gilman MZ. Cell-free activation of a DNA-binding protein by epidermal growth factor. *Nature* 1993; 362:79-83.
25. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 2005; 241:477-84.

26. Khaliulin I, Halestrap AP, Suleiman MS. Temperature preconditioning is optimal at 26° C and confers additional protection to hypothermic cardioplegic ischemic arrest. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236:736-45.
27. Salido EM, Dorfman D, Bordone M, Chianelli M, González Fleitas MF, Rosenstein RE. Global and ocular hypothermic preconditioning protect the rat retina from ischemic damage. *PLoS One* 2013; 8:e61656.
28. An J, Camara AK, Rhodes SS, Riess ML, Stowe DF. Warm ischemic preconditioning improves mitochondrial redox balance during and after mild hypothermic ischemia in guinea pig isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H2620-7.
29. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G608-16.
30. Henry SD, Nachber E, Tulipan J, et al. Hypothermic machine preservation reduces molecular markers of ischemia/reperfusion injury in human liver transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12:2477-86.
31. Koneru B, Shareef A, Dikdan G, et al. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant* 2007; 7:2788-96.
32. Cui LZ, Wang B, Chen LY, Zhou J. The effect of ischemic precondition to IL-6 on rat liver ischemia-reperfusion injury in transplantation. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6:395-9.

33. Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, et al. Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery* 2006;140:793-802.
34. Camargo CA, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997; 26:1513-20.
35. Myers KJ, Eppihimer MJ, Hall L, Wolitzky B. Interleukin-12-induced adhesion molecule expression in murine liver. *Am J Pathol* 1998; 152:457-68.
36. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170:2081-95.
37. Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004; 39:688-98.
38. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 1999; 30:203-8.
39. Peralta C, Fernández L, Panés J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001; 33:100-13.
40. Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, Ramshesh VK, Lemasters JJ. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against

storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. *Transplant Proc* 2006; 38:3351-7.

41. Ge M, Chi X, Zhang A, et al. Intestinal NF-E2-related factor-2 expression and antioxidant activity changes in rats undergoing orthotopic liver autotransplantation. *Oncol Lett* 2013; 6:1307-12.

42. Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 2004; 65:1238-47.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Liver expression of TNF- α (1a), IL-1 β (1b), IL-6 (1c) and IL-12 p70 (1d) after reperfusion (by ELISA assay). Data expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate a significant difference observed in the means of groups ($P < 0.05$). Abbreviations: NI- normothermic ischemia; IPC- ischemic preconditioning; TH- topical hypothermia.

Figure 2: Liver expression of IL-10 after reperfusion (ELISA assay). Data expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate a significant difference observed in the means of groups ($P < 0.05$). Abbreviations: NI- normothermic ischemia; IPC- ischemic preconditioning; TH- topical hypothermia.

Figure 3: Liver expression of nitric oxide synthase isoforms. 3a- Western blot analysis; 3b- eNOS expression (densitometry analysis); 3c- iNOS expression (densitometry analysis). Data expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate a significant difference observed in the means of groups ($P < 0.05$). Abbreviations: NI- normothermic ischemia; IPC- ischemic preconditioning; TH- topical hypothermia.

Figure 4: Liver expression of NQO1, Keap1 and Nrf2 (cytosolic and nuclear). 4a- Western blot analysis; 4b- NQO1 expression (densitometry analysis); 4c- Keap1 expression (densitometry analysis); 4d- cytosolic Nrf2 expression (densitometry analysis); 4e- Western blot analysis; 4f- Nuclear Nrf2 (densitometry analysis). Different letters indicate a significant difference observed in the means of groups ($P < 0.05$). Abbreviations: NI- normothermic ischemia; IPC- ischemic preconditioning; TH- topical hypothermia.

FIGURE 1 (A-D)

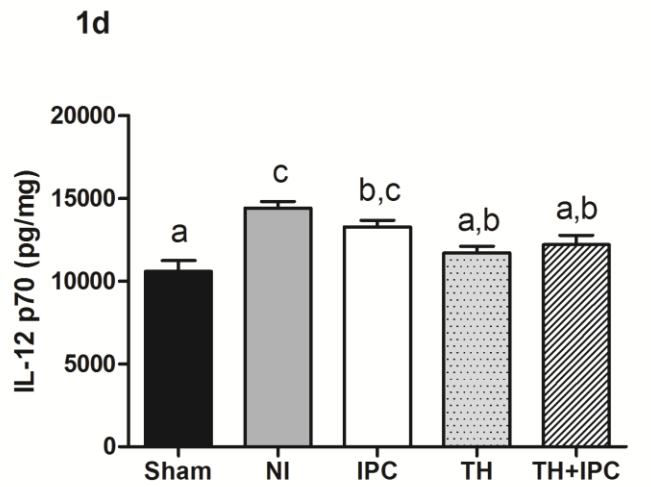
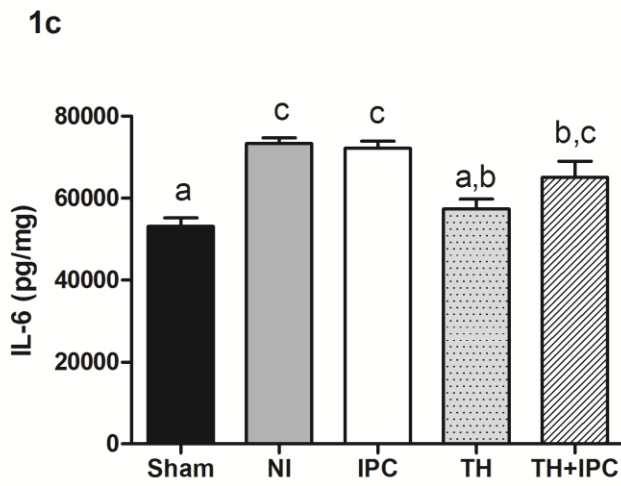
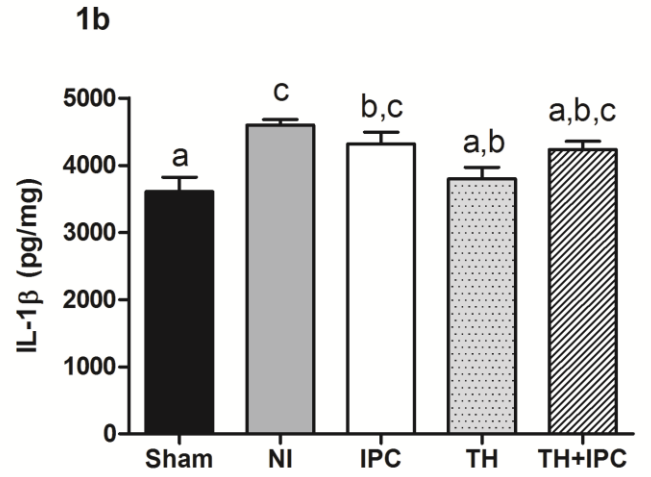
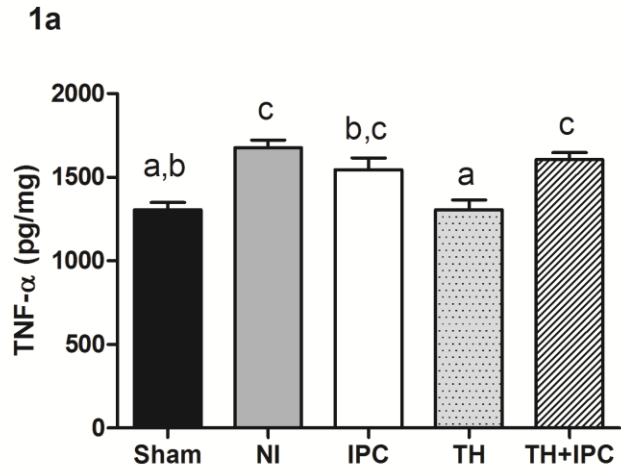


FIGURE 2

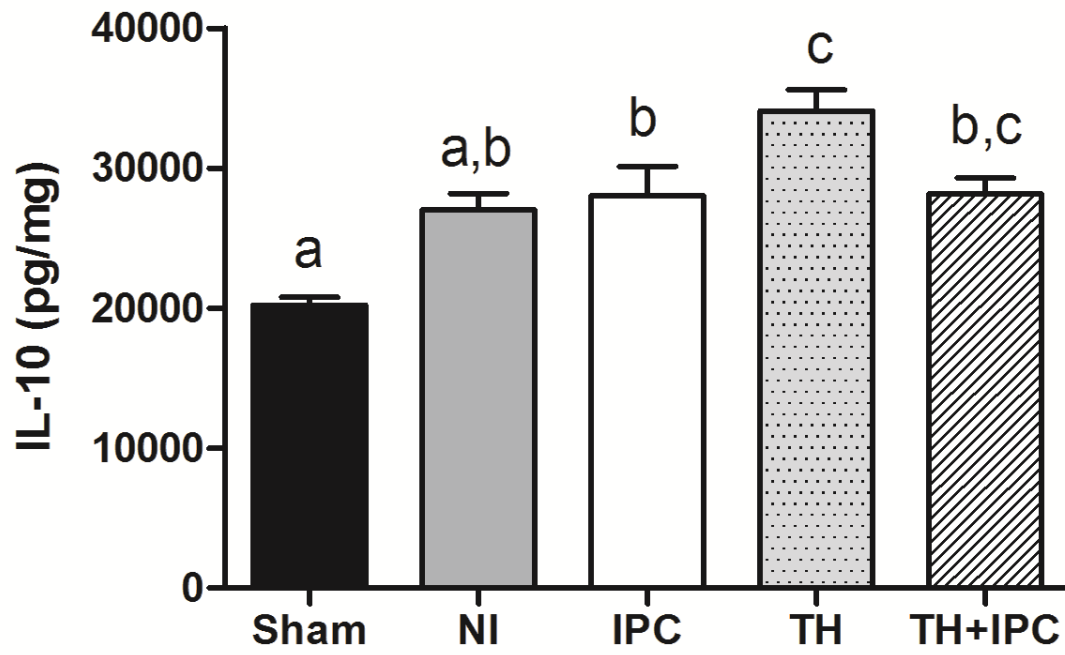


FIGURE 3 (A-C)

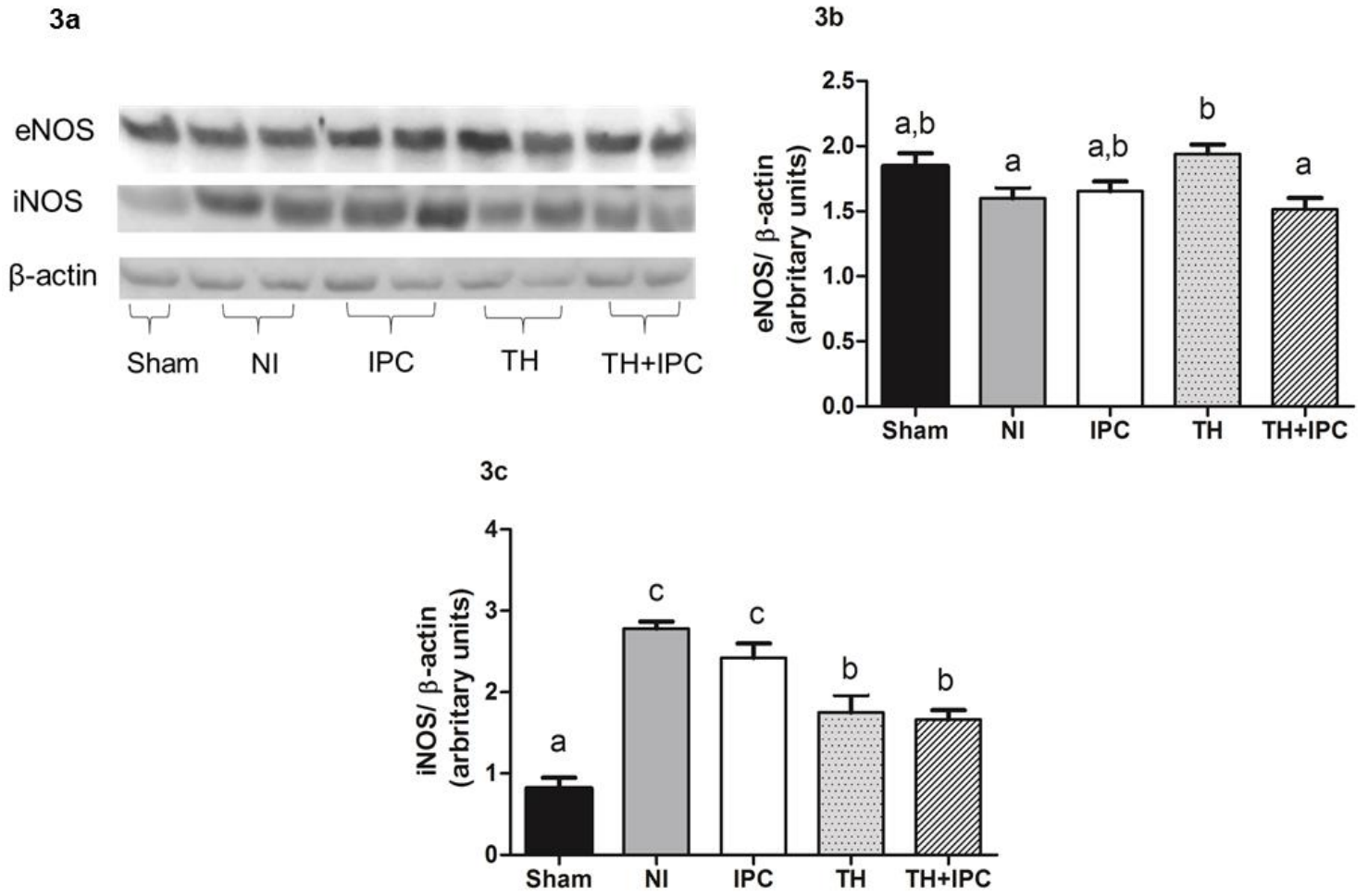
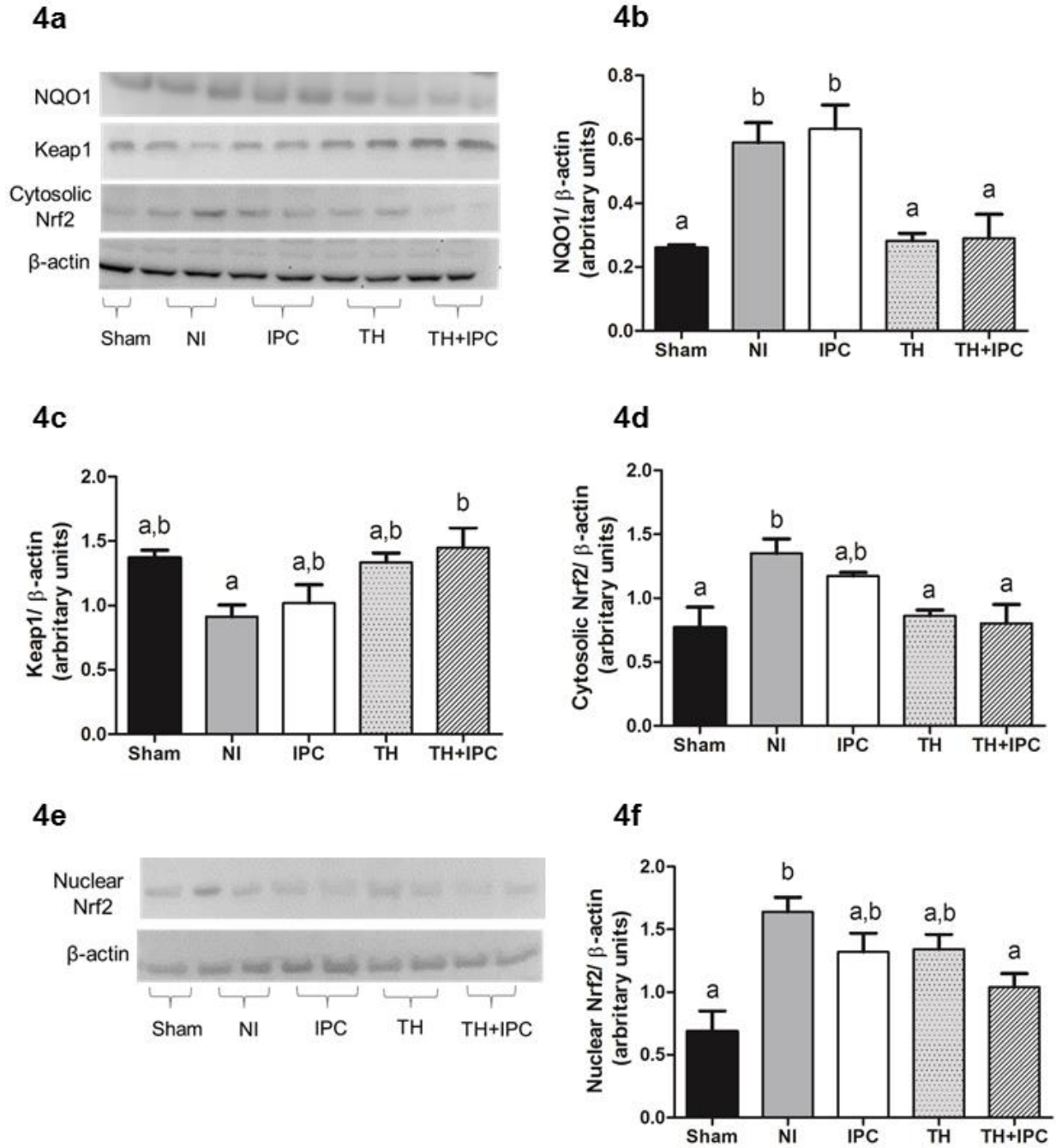


FIGURE 4 (A-F)



9. ORÇAMENTO E FONTES DE FINANCIAMENTO

Reagentes	Valor (R\$)
Kit ELISA TNF- α (eBioscience 88-7340)	555,75
Kit ELISA IL-1 (eBioscience 88-6010)	639,08
Kit ELISA IL-6 (BioSource KRC0061)	1.754,00
KIT ELISA IL-12p70 (BioSource KRC2371)	1.676,00
KIT ELISA IL-10 (BioSource KRC0102)	2.394,00
Anticorpo Primário NOS2/ Mouse Monoclonal (SC7271)	1.079,00
Anticorpo Primário NOS3/ Rabbit Polyclonal (SC8311)	1.079,00
Anticorpo Primário β -actina/ Mouse Monoclonal (SC8432)	1.079,00
Anticorpo Secundário Goat Anti-Mouse (SC2005)	335,00
Anticorpo Secundário Goat Anti-Rabbit (SC2004)	335,00
Acrylamide/Bis-acrylamide (A3699)	295,00
Solução HPR (WBKLS0050)	427,00
Total	11.647,83

A pesquisa foi financiada pelo FIPE-HCPA e PROAP-CAPES. Os demais reagentes não citados são de uso compartilhado do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG) do HCPA.

10. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos em relação à utilização das três distintas técnicas de proteção para a lesão inicial de I/R os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que:

A utilização da técnica de HT mostrou ser eficaz na proteção do processo inflamatório desencadeado pela lesão de I/R em relação aos marcadores pró-inflamatórios analisados. A utilização da técnica de PCI, de forma isolada ou associada à HT não preveniu o aumento das concentrações do TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p70.

A concentração do marcador anti-inflamatório, IL-10, no tecido hepático dos animais submetidos à lesão de I/R foi maior no grupo HT em relação ao grupo IN, resultado não demonstrado nos grupos submetidos às técnicas de PCI, de forma isolada ou associada à HT.

O grupo HT apresentou um aumento na expressão da eNOS e uma menor expressão da iNOS quando comparado ao grupo IN. O grupo PCI não demonstrou diferença significativa em relação a esses marcadores quando comparado ao grupo IN. A utilização da técnica de HT+PCI apresentou menor expressão da iNOS, mas em relação a esta molécula a utilização da técnica de HT de forma isolada demonstrou um comportamento semelhante.

A utilização da técnica de HT, de forma isolada ou associada ao PCI apresentou menor expressão proteica da NQO1, molécula antioxidante que atua na proteção celular contra a lesão de I/R.

Os grupos submetidos às técnicas de HT de forma isolada ou associada ao PCI apresentaram menor expressão do Nrf2 citoplasmático indicando o menor desacoplamento do complexo Nrf2-Keap1, resultado não observado no grupo PCI que apresentou expressões similares do Nrf2 citoplasmático e nuclear em comparação ao grupo IN. O uso combinado das técnicas de HT+PCI causou a inibição do complexo Nrf2-Keap1, prevenindo a translocação do Nrf2 para o núcleo da célula e a ativação das enzimas antioxidantes de segunda linha de ação.

11. PERSPECTIVAS

Nesse trabalho as análises foram realizadas no tecido hepático dos animais submetidos à isquemia por 90 minutos com subsequente reperfusão por 120 minutos, portanto avaliamos os danos iniciais ocasionados pela I/R. Assim, para podermos concluir a eficácia de cada uma das técnicas na proteção da lesão de I/R há a necessidade de realizar novos estudos com um tempo maior de reperfusão do tecido hepático, a fim de aproximar cada vez mais nossos estudos à realidade clínica.