

Rui Miguel Rua Filipe Martins

Transplantação hepática: novos fatores de prognóstico da regulação da função mitocondrial na isquemia/reperfusão

Tese de doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, orientada pelo Professor Doutor José Guilherme Tralhão e pelo Professor Doutor Carlos Palmeira e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Janeiro, 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Transplantação hepática: novos fatores de prognóstico da regulação da função mitocondrial na isquemia/reperfusão

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Medicina, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor José Guilherme Tralhão (Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina) e do Professor Doutor Carlos Palmeira (Universidade de Coimbra e Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra)

RUI MIGUEL RUA FILIPE MARTINS

2018

“It’s sometimes possible to make dreams come true. That’s what makes life so interesting”

Noel Grammont, em “A Colourful Wish” 2013

À minha família,

Índice

Agradecimentos	XI
Resumo.....	XV
Abstract.....	XVII
Lista de Figuras.....	XIX
Lista de Tabelas.....	XXI
Lista de Abreviaturas.....	XXIII
Parte I - INTRODUÇÃO	1
Conceitos gerais de transplantação hepática e da atividade mitocondrial	3
Transplantação hepática	3
Indicações e contraindicações	4
Insuficiência de órgãos e sistema de alocação de órgãos	8
Aspetos técnicos da transplantação hepática.....	11
Complicações da transplantação hepática	12
Complicações precoces	12
Complicações tardias	13
Alargamento dos critérios dos dadores	13
Soluções de preservação	14
Histologia funcional do fígado	17
Mitocôndria: considerações gerais e estrutura mitocondrial	20
Cadeia respiratória, fosforilação oxidativa e produção de energia.....	23
Permeabilidade de transição mitocondrial	29
Homeostase do cálcio	30
Mitocôndria e produção de ROS	31
Mitocôndria e processos de apoptose/necrose celular	32
Isquemia/reperfusão (I/R)	33
Alterações mitocondriais associadas à isquemia/reperfusão	35
Objetivos da tese.....	36
Parte II - MATERIAIS E MÉTODOS	39
CAPÍTULO I - Estudo clínico dos efeitos da I/R na função mitocondrial e metabolismo energético hepático em biópsias humanas de transplante hepático	41
Estudo da população e procedimentos cirúrgicos	41
Procedimento cirúrgico.....	44

Recolha das biópsias	45
Isolamento de mitocôndrias de fígado humano	45
Lavagem e purificação	46
Avaliação do potencial transmembranar nas mitocôndrias	46
Determinação da atividade respiratória das mitocôndrias.....	48
Quantificação de ATP	49
Avaliação da função hepática pós-operatória e evolução clínica	49
Análise estatística	49
CAPÍTULO II - Estudo experimental do efeito da I/R e da reperfusão hipotérmica na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático	
.....	51
Materiais	51
Animais e tratamentos.....	51
Métodos	51
Procedimento cirúrgico (I)	52
Recolha das biópsias (I)	53
Procedimento cirúrgico (II)	53
Recolha das biópsias (II)	54
Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	54
Lavagem e Purificação	55
Avaliação do potencial transmembranar nas mitocôndrias	55
Determinação da atividade respiratória das mitocôndrias.....	56
Quantificação de ATP	57
Avaliação histológica.....	58
Análise estatística	58
CAPÍTULO III - Estudo experimental do efeito da adição de Berberina à solução de preservação na função mitocondrial e metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático	
.....	59
Animais e tratamentos.....	59
Procedimento cirúrgico.....	59
Recolha das biópsias	60
Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato	60
Lavagem e Purificação	61
Avaliação do potencial transmembranar mitocôndrial.....	62
Determinação da atividade respiratória das mitocôndrias.....	63

Quantificação de ATP	64
Deteção da abertura do mPTP por indução de <i>swelling</i>	64
Quantificação de espécies reativas de oxigénio (ROS)	64
Análise de Western blotting	65
Isolamento de RNA e estudos de expressão genética avaliados por Real-Time PCR (qPCR)	65
Avaliação histológica	66
Análise estatística	67
Parte III - RESULTADOS	69
CAPÍTULO IV - Estudo clínico dos efeitos da I/R na função mitocondrial e metabolismo energético hepático em biópsias humanas de transplante hepático	71
Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP	71
Potencial membranar	71
Respiração mitocondrial	73
Quantificação de ATP	73
Tempos de isquemia/reperfusão e função mitocondrial	74
Função mitocondrial e biomarcadores da função hepatocelular e necrose	76
Função mitocondrial e resultados pós-operatórios	78
Discussão	79
CAPÍTULO V - Estudo experimental do efeito da I/R (I) e da reperfusão hipotérmica (II) na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático	83
Efeito da I/R na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático (I)	83
Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP	83
Potencial membranar	83
Respiração mitocondrial	85
Efeito da reperfusão hipotérmica na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático (II)	87
Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP	87
Potencial membranar	87

Respiração mitocondrial	89
Quantificação de ATP	91
Avaliação histológica	92
Microscopia ótica.....	92
Discussão.....	94
CAPÍTULO VI - Estudo experimental do efeito da adição de Berberina à solução de preservação na função mitocondrial e metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático	
97	
Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP	97
Potencial membranar	97
Respiração mitocondrial	99
Quantificação de ATP	101
Indução da permeabilidade transitória mitocondrial	101
Formação de espécies reativas de oxigénio (ROS)	103
Western blot	103
Real time PCR	105
Avaliação histológica	106
Microscopia ótica e microscopia eletrónica de transmissão.....	106
Discussão.....	109
Parte IV - DISCUSSÃO GERAL	113
BIBLIOGRAFIA	121

Agradecimentos

“Alice asked the Cheshire Cat, who was sitting in a tree, “What road do I take?”

The cat asked, “Where do you want to go?”

“I don’t know,” Alice answered.

“Then,” said the cat, “it really doesn’t matter, does it?”

Lewis Carroll, Alice's Adventures in Wonderland

Esta citação de Lewis Carroll encontra-se no livro Alice no País das Maravilhas e penso que traduz o meu percurso, pois contrariamente à personagem Alice, ainda era aluno na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e já tinha a aspiração, de no futuro, aliar a prática assistencial ao doente com a atividade de investigação.

Pelo seu percurso, o Professor Doutor José Guilherme Tralhão, foi uma fonte de inspiração pois mostrava que afinal era possível conjugar a atividade clínica com a investigação de excelência. Destaco particularmente a forma amável e aberta como aceitou ser meu orientador no Mestrado, transmitindo-me as bases para um pensamento crítico e a metodologia do processo de investigação. Demonstro a minha admiração pela sua enorme capacidade de trabalho, vocação científica, exímia aptidão analítica e rigor profissional. Ficarei eternamente grato por ter contribuído de forma tão decisiva e marcante para a minha carreira.

Seguidamente agradeço sinceramente ao Professor Doutor Carlos Marques Palmeira e à Professora Doutora Anabela Pinto Rolo, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho. Personalidades de reconhecido mérito nacional e internacional, dotados de elevada capacidade de trabalho, vocação científica invulgar, análise crítica e rigor profissional. Agradeço-lhes por toda a disponibilidade e por todo o incentivo demonstrados ao longo deste trabalho. Demonstro a minha enorme gratidão e espero poder continuar a aprender convosco em futuros projetos.

Deve-se ao Dr. Emanuel Furtado a possibilidade de realização deste trabalho na área da transplantação hepática. Profissional de excelência, dotado de uma cultura, capacidade intelectual e técnica notáveis, sempre foi uma referência que tentei seguir. Por todas as oportunidades, ensinamentos e críticas dedico de forma muito particular este trabalho.

Não podendo enumerar todas as pessoas que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este caminho fosse possível, irei apenas deixar patente o meu tributo às mais relevantes.

Como dizia Antoine de Saint-Exupéry *“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*. Esta frase dedico à memória do responsável por ter escolhido este caminho da Medicina e em particular da Cirurgia, ao meu cunhado João Conceição. Obrigado.

Devo reconhecer o papel dos que marcaram a minha formação Médica. Destaco o meu primeiro Diretor de Serviço, o Dr. Carlos Janelas, que foi fundamental no início da minha carreira, apoiando as minhas ideias e projetos, facto que contribuiu para o meu crescimento profissional.

Agradeço também aos meus Diretores de Serviço Dr. Carlos Magalhães, Professor Doutor Carlos Costa Almeida e à Dra. Isabel Cristina pelas oportunidades que me proporcionaram e ao apoio prestado.

Ao Dr. António Firmo, dotado de uma cultura de excelência, profissional rigoroso, competente, dotado de elevadas qualidades teóricas e técnicas, pelos ensinamentos que me proporcionou, com os quais marcou de forma indelével a minha formação.

A todos os meus colegas pelo constante apoio e incentivo para a concretização deste trabalho. Agradecer aos elementos da Unidade de Transplantação Hepática de Crianças e Adultos e do Serviço de Cirurgia A dos CHUC, nas pessoas da Dra. Dulce Diogo, do Prof. Doutor Henrique Alexandrino, do Dr. Marco Serôdio e do Dr. Ricardo Martins.

Aos colegas do Mitolab, Prof. Doutor João Soeiro Teodoro, Doutora Ana Varela e ao Doutor Filipe Valente, pelo apoio constante, empenho, capacidade crítica fundamentais para o desenrolar deste trabalho.

De realçar o papel fundamental que teve a Prof.^a Doutora Margarida Abrantes e a Prof.^a Doutora Maria Filomena Botelho (Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), pela disponibilidade e pelo apoio prestado.

Agradeço ao Dr. Rui Caetano Oliveira (Serviço de Anatomia Patológica do CHUC) pelo apoio prestado na análise histológica e análise crítica dos resultados; à Prof.^a Maria do Carmo Romão pelo apoio dispensado na redação do Inglês; à Dra. Clara Rocha e Dra. Margarida Marques pelo apoio prestado na análise estatística.

A todos os meus colegas, professores e funcionários que foram cruzando o meu caminho e deixando o seu contributo na minha vida e no meu percurso.

Agradeço à Sociedade Portuguesa de Transplantação / Astellas pharma e à CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia) pelos prémios atribuídos, que foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos, e muito em particular ao Nuno Pacheco Mendes pelo apoio prestado e pelas constantes palavras de incentivo.

Aos meus pais, responsáveis pela minha educação e pelo que sou hoje, sempre presentes, que o seu apoio incondicional e incentivos foram fundamentais para a prossecução dos meus desígnios.

À minha irmã pelo apoio e por tudo o que sempre fez por mim.

Agradeço de forma especial, à Vanda, que sempre esteve ao meu lado, partilhando alegrias e tristezas, apoiando-me em qualquer momento. Muito obrigado.

Às minhas filhas, Marta e Joana, e aos meus sobrinhos Sofia, Maria João e Daniel, que sigam sempre os seus sonhos e que nunca deixem de lutar por eles.

Follow your dreams, believe in yourself and don't give up

Rachel Corrie

Resumo

A transplantação hepática é a única opção terapêutica com caráter definitivo, para situações de doença hepática crónica terminal ou falência hepática aguda. A insuficiência de órgãos é um dos principais obstáculos à transplantação, pelo que, todo o esforço realizado no sentido de aumentar a quantidade/qualidade dos órgãos disponíveis terá impacto na sobrevida dos doentes.

Na transplantação hepática ocorre um processo específico de isquemia/reperfusão, onde o fígado é completamente revascularizado após um período de hipoxia, induzida inicialmente pelo frio e posteriormente pela reperfusão de sangue venoso.

Em consequência deste processo de isquemia/reperfusão podem resultar lesões celulares. Dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos, sabe-se que uma das principais alterações ocorre ao nível do metabolismo energético envolvendo a função mitocondrial.

O objetivo desta dissertação foi identificar o papel da disfunção mitocondrial no contexto da transplantação hepática, realizando para tal, um estudo clínico em fígados humanos utilizados na transplantação hepática e transpor esses eventos para o modelo animal de modo a identificar estratégias de proteção da função mitocondrial.

O estudo clínico consistiu em isolar mitocôndrias de fígados a partir de duas biópsias hepáticas de tecido vivo, tendo uma sido colhida no final do período de isquemia fria e a outra após reperfusão arterial. Esta análise permitiu identificar nos fígados dos doentes submetidos a transplante hepático, que a disfunção mitocondrial está intimamente relacionada com a lesão induzida pela isquemia/reperfusão e que a disponibilidade bioenergética se encontra diminuída após a reperfusão. Identificou-se que variações nos tempos de isquemia fria não interferem nas alterações dos parâmetros de função mitocondrial nem da disponibilidade bioenergética. Definiram-se biomarcadores clínicos (transaminase glutâmico-oxalacética, bilirrubina direta, lactato arterial) como novos fatores de prognóstico precoce da evolução clínica no pós-operatório do transplante hepático.

No estudo experimental realizado no rato, como modelo animal, verificou-se que tal como no estudo clínico, a disfunção mitocondrial está intimamente relacionada com a lesão induzida pela isquemia/reperfusão. Verificou-se que a variação nos tempos de isquemia fria não agrava as alterações dos parâmetros de função mitocondrial nem da

disponibilidade bioenergética. Os estudos sobre reperfusão hipotérmica demonstraram um efeito protetor sobre a função mitocondrial com repercussão na disponibilidade bioenergética tecidual.

Foi estudado o efeito da adição de Berberina à solução de preservação identificando-se o seu papel protetor na atividade mitocondrial e na preservação bioenergética. Inferiu-se que este papel se deve à expressão genética de genes que atuam como reguladores do metabolismo celular, interferindo na biogénese mitocondrial e no processo de mitofagia.

Este estudo translacional permitiu identificar novos fatores de prognósticos clínicos e contribuiu para o desenvolvimento de novas estratégias de proteção mitocondrial, que poderão levar a uma melhoria dos resultados clínicos na transplantação hepática.

Palavras-chave: Transplantação hepática, Isquemia/Reperfusão, Mitocôndria, Bioenergética, Soluções de preservação hepática

Abstract

A liver transplantation is the only definitive therapeutic option for situations of chronic terminal liver disease or acute liver failure. Organ failure is one of the main hindrances to transplants, so any effort to increase the number of organs available will have an impact on the quality of life and patient survival.

In the hepatic transplant, a specific process of ischemia/reperfusion occurs, in which the liver is completely revascularized after a period of hypoxia, initially induced by cold and then by the reperfusion of venous blood.

Because of this ischemia/reperfusion process cellular lesions may result. Of the cellular and molecular mechanisms involved, it is known that one of the main alterations occurs at the level of energetic metabolism involving the mitochondrial function.

The objective of this dissertation is to identify the role of the mitochondrial dysfunction in the context of a liver transplant, performing a clinical study on human livers used in liver transplants and to transfer these events to the animal model in order to identify strategies for protecting the mitochondrial function.

The clinical study consisted of isolating mitochondria from livers from two liver biopsies of living tissue, one having been collected at the end of the cold ischemia period and the other after the arterial reperfusion. This analysis allowed to identify in livers of patients undergoing liver transplantation that mitochondrial dysfunction is closely related to injury induced by ischemia/reperfusion and that the bioenergetic availability is impaired after the reperfusion. It was identified that variations in the cold ischemia times do not interfere in alterations of the mitochondrial function parameters or bioenergetic availability. Clinical biomarkers (glutamic-oxalacetic transaminase, direct bilirubin, arterial lactate) were defined as new factors for an early prognosis of clinical evolution in the postoperative period of liver transplant.

In the experimental study conducted in the mouse as an animal model, it was found that, as in the clinical study, mitochondrial dysfunction is closely related to an ischemia/reperfusion injury. It has been found that the variation in cold ischemia times does not aggravate changes in the mitochondrial function parameters nor those of bioenergetic availability. Studies on hypothermic reperfusion established a protective effect on the mitochondrial function with repercussion on tissue bioenergetic availability.

The effect of adding Berberine to the preservation solution was studied and its protective role in mitochondrial activity and contributing to bioenergetic preservation identified. It was inferred that this role is due to the genetic expression of genes which act as regulators of the cellular metabolism, interfering in mitochondrial biogenesis and in the process of mitophagy.

This translational study allowed to identify new factors of clinical prognosis and contributed to the development of new strategies of mitochondrial protection, which could lead to an improvement of clinical results in liver transplantation.

Keywords: Liver transplantation, Ischemia/reperfusion, Mitochondria, Bioenergetics, Liver preservation solutions

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição por diagnóstico clínico dos doentes em lista de espera para transplantação hepática nos EUA	6
Figura 2- Características evolutivas das indicações clínicas para transplante hepático em adultos nos EUA	7
Figura 3- Correlação de sobrevivência entre os modelos MELD e PELD	10
Figura 4- Histologia do lóbulo hepático normal.....	18
Figura 5- Representação esquemática do espaço porta típico	18
Figura 6- Esquema representativo da relação espacial entre as diferentes células do fígado.....	19
Figura 7- Fórmula da adenosina trifosfato (ATP).....	21
Figura 8- Representação dos principais elementos da estrutura mitocondrial	22
Figura 9- Ilustração dos principais processos que ocorrem na respiração celular aeróbia.....	24
Figura 10- Representação esquemática dos 5 complexos da cadeia respiratória mitocondrial.....	26
Figura 11- Representação da teoria quimiosmótica mostrando o fluxo de eletrões ao longo da cadeia respiratória.	27
Figura 12- Cronograma das diferentes fases de I/R durante a transplantação hepática	34
Figura 13- Representação esquemática das variações dos tempos de isquemia fria mantendo constantes os tempos de reperfusão.....	52
Figura 14- Representação esquemática da reperfusão sob condições de hipotermia e normotermia	53
Figura 15- Representação esquemática da metodologia utilizada para o estudo da adição de berberina (BBR) à solução de preservação hepática	60
Figura 16- Representação gráfica dos parâmetros da função mitocondrial na transplantação hepática.	72
Figura 17- Gráfico representativo dos valores da quantificação de ATP presente nas biópsias hepáticas dos transplantes hepáticos.....	74
Figura 18- Representação esquemática das variações dos tempos de isquemia fria, isquemia quente e reperfusão arterial até à conclusão do transplante hepático.	74
Figura 19- Gráfico da medição do potencial de membrana inicial ($\Delta\psi$) nas biópsias hepáticas nos diferentes grupos de animais.....	84
Figura 20- Gráfico da medição da <i>Lag phase</i> nas biópsias hepáticas nos diferentes grupos de animais	84
Figura 21- Representação do estado 3 respiratório mitocondrial nas biópsias hepáticas nos diferentes grupos de animais.....	85
Figura 22- Representação do índice de controlo respiratório nas biópsias hepáticas nos diferentes grupos de animais.....	86

Figura 23- Gráfico da medicação do potencial de membrana inicial ($\Delta\psi$) entre o grupo controlo, o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica).	88
Figura 24- Gráfico da medicação da Lag phase entre o grupo controlo, o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica).	88
Figura 25- Representação dos valores de estado 3 respiratório obtidos entre o grupo controlo, o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica).	90
Figura 26- Representação dos valores de índice de controlo respiratório obtidos entre o grupo controlo, o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica).	90
Figura 27- Gráfico representativo dos valores da quantificação de ATP obtidos entre o grupo controlo, o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica).	91
Figura 28- Controlo. Microscopia ótica de tecido hepático com arquitetura preservada.	92
Figura 29- Microscopia ótica de tecido hepático. Reperfusão hipotérmica.....	92
Figura 30- Microscopia ótica de tecido hepático. Reperfusão normotérmica.	93
Figura 31- Gráfico da medicação do potencial de membrana inicial ($\Delta\psi$) entre o grupo controlo, o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR).	98
Figura 32- Gráfico da medicação da Lag phase entre o grupo controlo, o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR).....	98
Figura 33- Representação dos valores de estado 3 respiratório obtidos entre o grupo controlo, o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR).	100
Figura 34- Representação dos índice de controlo respiratório obtidos entre o grupo controlo, o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR).	100
Figura 35- Gráfico representativo dos valores da quantificação de ATP obtidos entre o grupo controlo, o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR).	101
Figura 36- Indução da permeabilidade transitória mitocondrial em mitocôndrias hepáticas de animais obtidos entre o grupo A (BBR) e o grupo B (I/R sem BBR).....	102
Figura 37- Representação gráfica da produção de H_2O_2 nas mitocôndrias hepáticas de ratos submetidos a I/R hepática entre o grupo A (BBR) e o grupo B (I/R sem BBR) avaliado por fluorescência de H_2DCFDA	103
Figura 38- Representação gráfica da quantificação proteica (LC3 I e II, SirT1 e SirT3, PGC-1 α e B-Actin) nos fígados dos ratos do grupo controlo e nos grupos submetidos a I/R na presença ou ausência de BBR.	104
Figura 39- Representação gráfica da expressão genética (SirT1 e SirT3, PGC-1 α , MnSOD2, COX IV e NDUFS8) nos fígados dos ratos submetidos a I/R na presença ou ausência de BBR.....	105
Figura 40- Biópsia hepática. I/R com adição de berberina.....	106
Figura 41- I/R com adição de berberina. Microscopia electrónica de transmissão de tecido hepático de rato.	107
Figura 42- Biópsia hepática. I/R sem adição de berberina.....	107
Figura 43- I/R sem adição de berberina. Microscopia electrónica de transmissão de tecido hepático de rato.	108

Lista de Tabelas

Tabela 1- Indicações para transplantação hepática.....	5
Tabela 2- Contraindicações absolutas e relativas para Transplantação Hepática	8
Tabela 3- Escala de MELD.....	9
Tabela 4- Composição das soluções de preservação UW, HTK e Celsior.....	15
Tabela 5- Estratégias de proteção e função bioquímica dos componentes das soluções de preservação.....	16
Tabela 6- Dados clínicos dos doentes transplantados.....	42
Tabela 7- Dados clínicos dos doadores hepáticos	44
Tabela 8- Potencial membranar e <i>lag phase</i> das mitocôndrias hepáticas das biópsias.....	72
Tabela 9- Valores da respiração mitocondrial obtidos nas biópsias hepáticas dos transplantes hepáticos	73
Tabela 10- Correlação entre os tempos de isquemia fria, isquemia quente e tempo total da intervenção cirúrgica com as variações nos parâmetros de potencial de membrana mitocondrial.....	75
Tabela 11- Correlação entre os tempos de isquemia fria, isquemia quente e tempo total da intervenção cirúrgica com as variações nos parâmetros de respiração mitocondrial.....	75
Tabela 12- Função mitocondrial e função hepática pós-operatória.....	77
Tabela 13- Correlações entre as variações de potencial de membrana mitocondrial e morbidade precoce, morbidade tardia e mortalidade.....	78
Tabela 14- Correlações entre as variações de respiração mitocondrial e morbidade precoce, morbidade tardia e mortalidade.....	78
Tabela 15- Comparação dos parâmetros de potencial membranar e lag phase entre o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica)	87
Tabela 16- Valores da respiração mitocondrial obtidos nas biópsias hepáticas dos grupos de animais submetidos a reperfusão hipotérmica e normotérmica.	89
Tabela 17- Comparação dos parâmetros de potencial membrana e lag phase entre o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR)	97
Tabela 18- Valores da respiração mitocondrial obtidos entre o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR)	99

Lista de Abreviaturas

- $\Delta\Psi_m$ – Potencial transmembrana
 $\Delta\mu_{H^+}$ – Gradiente electroquímico
Acetil-CoA – Acetilcoenzima A
ADP – Adenosina difosfato
AMP – Adenosina monofosfato
ATP – Adenosina trifosfato
AVC – Acidente vascular cerebral
Bcl2 – Célula-B de linfoma 2, proteína reguladora de apoptose
BSA – Albumina de soro bovino deslipidado
COX IV – Citocromo c oxidase, subunidade IV
CsA – Ciclosporina A
Cyt c – Citocromo c
DMSO – Sulfóxido de dimetilo
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ER – Retículo endoplasmático
ETC – Cadeia transportadora de eletrões
FADH₂ – Dinucleótido de flavina e adenina (forma reduzida)
FBS – Soro bovino fetal
H₂O₂ – Peróxido de hidrogéneo
H&E – Hematoxilina e eosina
HTA – Hipertensão arterial
ICR – Índice de controlo respiratório
IMC – Índice de massa corporal
IMS – Espaço intermembranoso
INR – Índice internacional normalizado
I/R – Isquemia/Reperusão
LDH – Desidrogenase láctica
MAC – Canais indutores de apoptose mitocondrial
MCU – Uniporte mitocondrial de cálcio
MELD – Modelo para doença hepática terminal
MME – Membrana mitocondrial externa
MMI – Membrana mitocondrial interna
MnSOD2 – Superóxido dismutase mitocondrial 2

MPT – Permeabilidade de transição mitocondrial
mPTP – Poro de transição da permeabilidade mitocondrial
mRNA – RNA mensageiro
mtDNA – DNA mitocondrial
NAD⁺ – Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma oxidada
NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida
NDSUF8 – NADH-ubiquinona oxidoreductase
NO – Óxido nítrico
O₂^{·-} – Ânion superóxido
OH[·] – Radical hidroxilo
OPA1 – *Optic atrophy protein 1*
OXPHOS – Fosforilação oxidativa
PAF – Polineuropatia amiloidótica familiar
PELD – Modelo pediátrico para doença hepática terminal
PGC-1 α – *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
P_i – Fosfato inorgânico
PKs – Proteína quinase
RFUs – Unidades de fluorescência arbitrária
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reactivas de oxigénio
rRNA – Rna ribossômico
siRNA – RNA interferência
SirT1 – Sirtuína 1
SirT3 – Sirtuína 3
TCA ciclo – Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs
TCE – Traumatismo cranioencefálico
TGF- α – Factor de transformação do crescimento α
TGO – Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP – Transaminase glutâmico-pirúvica
TNF- α – Factor de necrose tumoral α
TPP⁺ – Ião tetrafenilfosfónio
tRNA – RNA transferência
UCI – Unidade de cuidados intensivos

Parte I

INTRODUÇÃO

Conceitos gerais de transplantação hepática e da atividade mitocondrial

Transplantação hepática

A transplantação hepática é a única opção terapêutica, com caráter definitivo, no tratamento de doentes em falência hepática aguda ou com doença hepática terminal. Estima-se que na atualidade, o número de transplantes hepáticos realizados na Europa e nos Estados Unidos da América seja de 6000 transplantes/ano, com taxas de sobrevivência aos 5 anos de 70 % [1, 2].

No ano de 1954, foi descrito o primeiro transplante no ser humano, que consistiu num transplante renal entre gémeos. O sucesso deste procedimento esteve provavelmente relacionado com o facto de não ter havido necessidade de realizar terapêutica imunossupressora.

Antes de 1960 foram iniciados os primeiros trabalhos de investigação na área da transplantação hepática. Em 1963, Thomas Starzl, que até a essa data tinha liderado a maioria das investigações utilizando cães como modelo animal, foi o primeiro a efetuar um transplante hepático ortotópico no ser humano, que não teve êxito por complicações relacionadas com o procedimento cirúrgico. Apesar deste feito, só em 1967, é que foi realizado com sucesso o primeiro transplante hepático [3, 4].

Fortner, em 1970, descreveu pela primeira vez a utilização de fígado heterotópico. Este facto contribuiu, para que mais tarde, fossem desenvolvidas diferentes técnicas cirúrgicas, sendo de salientar o transplante hepático auxiliar (procedimento no qual o órgão nativo pode ser preservado quando se espera uma recuperação do órgão) e a divisão hepática (*Split-liver*) que possibilitou a utilização de fígados de doadores vivos na transplantação hepática [5-7].

Na década de 80, um dos principais problemas da transplantação hepática estava relacionado com a baixa taxa de sobrevivência que se aproximava dos 20 % aos 5 anos. Esta realidade foi alterada devido ao desenvolvimento de fármacos imunossupressores, sendo de realçar a descoberta da ciclosporina, que ao reduzir a taxa de rejeição, permitiu que o transplante hepático se tornasse uma realidade clínica [8, 9].

Em 1983, foi estabelecido pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH), que o transplante hepático fosse uma opção terapêutica com caráter definitivo nas situações

de doença hepática terminal, assistindo-se desde aí, a uma enorme proliferação de centros especializados de transplantação [10].

A transplantação hepática reveste-se de primordial importância no tratamento de doentes com insuficiência hepática, e que graças aos avanços nos conhecimentos e aos resultados obtidos, permitiu um alargamento progressivo das suas indicações [11].

No início da transplantação hepática, o tratamento de tumores hepáticos malignos era pouco expressivo, dada a elevada percentagem de recorrência e a baixa taxa de sobrevivência aos 5 anos (15,2 %). Esta realidade tem sido progressivamente alterada, como consequência da melhoria dos aspetos técnicos associados à aquisição de novos conceitos no domínio da oncologia e da imunologia [12, 13]. Estes factos, permitiram a fusão da cirurgia de transplantação à oncologia cirúrgica, condicionando o início de uma mudança de paradigma no tratamento multidisciplinar dos tumores hepáticos [14-17].

Na atualidade a transplantação hepática é uma opção terapêutica que possibilita a obtenção de taxas de sobrevivência superiores a 90 %, derivados da melhoria no seguimento do doente com insuficiência hepática, associados à seleção e preservação dos órgãos e a alocação destes de acordo com o grau de gravidade dos doentes [18].

Indicações e contraindicações

A transplantação hepática é uma opção terapêutica válida quer na idade pediátrica quer em adultos, e pode estar indicada num amplo espectro de doenças hepáticas, onde se incluem a falência hepática aguda/crónica, as alterações metabólicas/congénitas e algumas neoplasias hepáticas. Independentemente das condições etiológicas que estão na génese destas indicações, todas apresentam um denominador comum que se caracteriza pelo início de um quadro de descompensação hepática (Tabela 1) [19-21].

Indicações para Transplantação Hepática	
Insuficiência hepática aguda	
	Hepatite vírica
	Lesões induzidas por tóxicos (paracetamol, cogumelos, outros)
	Doença de Wilson fulminante
	Tirosinemia fulminante
Insuficiência hepática crônica	
	Doença colestática (cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, atresia biliar, síndromes de colestase familiar)
	Doença hepatocelular (hepatite vírica, cirrose alcoólica, hepatite autoimune)
	Doença Vascular (Budd-Chiari, doença veno-oclusiva)
	Esteatose severa
Neoplasias/Lesões ocupando espaço	
	Carcinoma hepatocelular
	Hepatoblastoma
	Hemangioendotelioma
	Tumor neuroendócrino metastático
	Doença hepática poliquística
	Adenomatose múltipla
Doenças Metabólicas	
	Défice de α 1- antitripsina
	Polineuropatia amiloidótica familiar (PAF)
	Doença de Wilson
	Tirosinemia
	Hemocromatose
	Doença de armazenamento do glicogénio tipo I e IV
	Fibrose quística
	Protoporfíria eritropoiética (EPP)
	Síndrome de Crigler-Najjar
	Oxalose
	Défice enzimático do ciclo da ureia
	Deficiência de proteína C
	Hemofilia A
Falência do enxerto	
	Rejeição (aguda ou crônica)
	Falência primária do enxerto
	Problemas técnicos

TABELA 1- INDICAÇÕES PARA TRANSPLANTAÇÃO HEPÁTICA

Nos EUA, as principais indicações clínicas para transplantação hepática são a cirrose não colestática (73 %), seguida da doença hepática colestática (10 %) (Figura 1) [22].

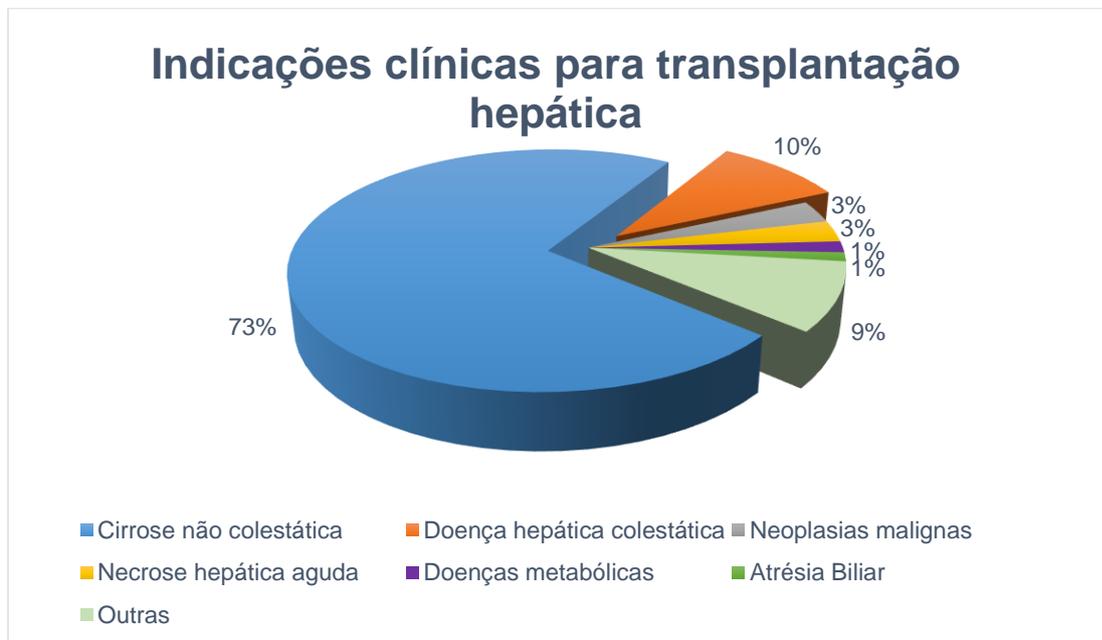


FIGURA 1- DISTRIBUIÇÃO POR DIAGNÓSTICO CLÍNICO DOS DOENTES EM LISTA DE ESPERA PARA TRANSPLANTAÇÃO HEPÁTICA NOS EUA

As indicações variam de acordo com a idade dos doentes. Na idade pediátrica, a indicação mais frequente é a atresia biliar (58 %), enquanto nos adultos a indicação mais comum é a doença hepatocelular crónica não colestática como consequência da elevada frequência de cirrose derivada da infeção provocada pelo vírus da hepatite C. Como consequência da recente introdução na prática clínica de fármacos para o tratamento da hepatite C (sofosbuvir e ribavirina), poderemos vir a assistir nos próximos anos a uma diminuição do número de transplantes por esta causa (Figura 2) [22].

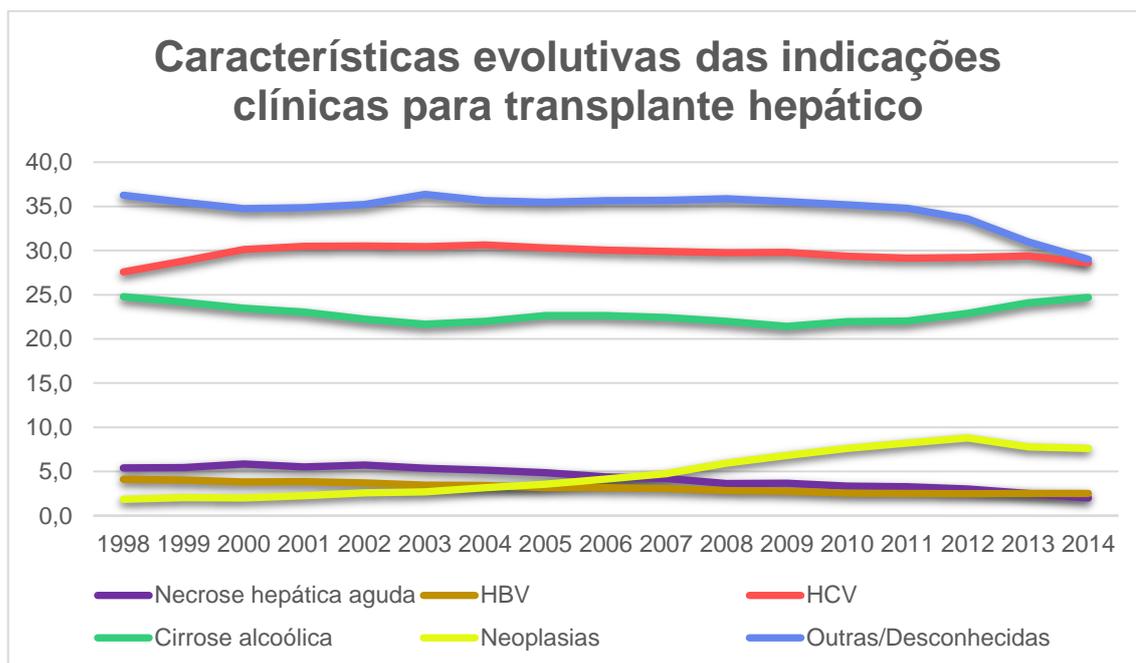


FIGURA 2- CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS DAS INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA TRANSPLANTE HEPÁTICO NOS EUA

Em termos gerais, as contra-indicações estão diretamente relacionadas com as comorbidades dos doentes, que podem impossibilitar a realização de um procedimento desta magnitude. O potencial candidato deve ser alvo de um estudo exaustivo, onde se incluem uma avaliação da função cardíaca, pulmonar, renal, a análise do estado mental e a caracterização socioeconómica, aspetos fundamentais que permitem determinar o risco/benefício individual.

As contra-indicações para a realização de um transplante hepático, podem ser divididas em dois grupos: absolutas e relativas (Tabela 2) [23].

Contraindicações
Absolutas
Défices cognitivos ou incapacidade em cumprir tratamento de imunossupressão
Infeção sistêmica não controlada
Doença cardiopulmonar avançada
Etilismo ativo ou consumo de drogas
Síndrome da imunodeficiência adquirido (AIDS)
Carcinoma hepatocelular metastático
História pessoal de doença oncológica recente
Alterações anatómicas que impeçam a transplantação
Relativas
Idade superior a 75 anos
Sepsis de origem hepatobiliar
Colangiocarcinoma
Infeção por HIV
Falência multiorgânica necessitando de suporte cardiopulmonar
Malnutrição severa

TABELA 2- CONTRAINDICAÇÕES ABSOLUTAS E RELATIVAS PARA TRANSPLANTAÇÃO HEPÁTICA

Insuficiência de órgãos e sistema de alocação de órgãos

A principal limitação da transplantação está relacionada com a falta de órgãos. Esta insuficiência de órgãos levou ao desenvolvimento de sistemas de classificação, baseados em dados objetivos, com a finalidade de permitir alocar de uma forma mais eficaz os órgãos disponíveis. Na atualidade, a maioria dos países adotou um sistema de classificação numérico denominado por MELD (*model for end-stage liver disease*), baseado nas condições clínicas do doente, permite determinar qual a probabilidade de mortalidade por doença hepática crônica em 3 meses (Tabela 3) [24, 25].

Escala de MELD (probabilidade de mortalidade em 3 meses)
≥40 — 100 % de mortalidade
30–39 — 83 % de mortalidade
20–29 — 76 % de mortalidade
10–19 — 27 % de mortalidade
<10 — 4 % de mortalidade

TABELA 3- ESCALA DE MELD

As classificações anteriores à escala de MELD caíram em desuso, pois baseavam-se em dados subjetivos. Por exemplo, a classificação de Child-Turcotte-Pugh, não é facilmente mensurável visto ser baseada na quantificação do grau de ascite ou do grau de encefalopatia, podendo originar assimetrias na caracterização do risco clínico dos doentes.

Para o cálculo destes modelos são utilizados os valores de bilirrubina total, creatinina e INR (*international normalized ratio*). Considera-se que para valores de MELD inferiores a 15, o risco de mortalidade em lista de espera é inferior ao risco de mortalidade após transplante [26, 27].

Os doentes com quadros clínicos mais graves, têm preferência na atribuição dos órgãos, possibilitando deste modo, uma priorização da lista de espera de acordo com a gravidade das situações clínicas. No caso, de dois ou mais doentes terem os mesmos valores de MELD, a prioridade será atribuída ao doente que se encontra há mais tempo em lista de espera.

Na idade pediátrica, até aos 12 anos de idade, utiliza-se a escala PELD (*pediatric end-stage liver disease*) cujo cálculo tem por base a idade (menor ou maior de 1 ano de idade), o crescimento estato-ponderal, acompanhados dos valores de bilirrubina total, INR e albumina (Figura 3) [28-30].

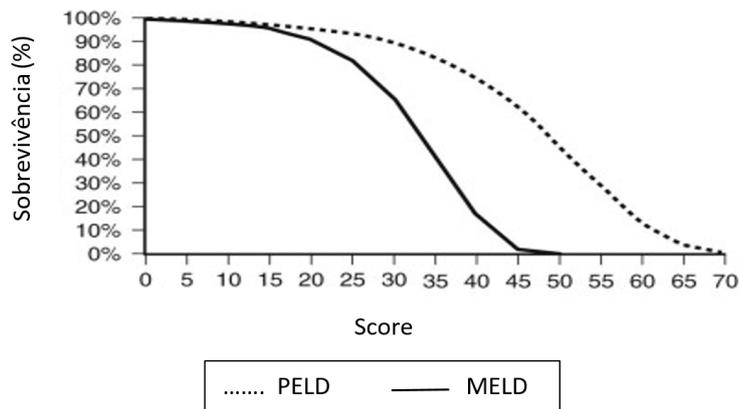


FIGURA 3- CORRELAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA ENTRE OS MODELOS MELD E PELD

Quando os doentes têm os mesmos valores de MELD e PELD, por princípio, o órgão deverá ser alocado ao doente com idade pediátrica.

Existem algumas exceções à escala de MELD, sendo de salientar os hepatocarcinomas, seguido de outras patologias menos frequentes como a amiloidose, a hipertensão portopulmonar e a síndrome hepatopulmonar [31-33].

Durante a década de 1990, foram introduzidos na prática clínica os critérios de Milão, com o objetivo de selecionar dentro dos doentes cirróticos com hepatocarcinoma, aqueles com indicação para transplante hepático. Com base nestes critérios (tumor único até 5 cm ou três tumores com dimensões até 3 cm cada e ausência de trombose na veia porta) houve uma melhoria da sobrevivência aos 5 anos de 70 % e redução da recorrência para valores inferiores a 10 % [34, 35].

Tendo por objetivo a avaliação prognóstica e a estratificação das diversas opções terapêuticas, surgiram outros sistemas de estadiamento clínico dos doentes com hepatocarcinoma. O sistema mais utilizado é a classificação de Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), baseada em estudos randomizados controlados, e que inclui a classificação de Child-Pugh, escalas de performance clínica (ECOG) e dados relativos à caracterização do tumor (nódulo solitário ou multinodular, invasão vascular ou disseminação extra-hepática) [36].

Aspetos técnicos da transplantação hepática

Na transplantação hepática o órgão é implantado na sua localização nativa (transplante ortotópico), contrariamente ao que acontece na transplantação renal, na qual o órgão é colocado numa posição distinta da sua localização habitual (transplante heterotópico).

Os transplantes ortotópicos são procedimentos mais complexos, pois no caso do fígado, obriga à realização de uma hepatectomia total do fígado nativo e posterior implante total ou parcial do enxerto.

A hepatectomia total para remoção do fígado nativo, é um procedimento que pode ser extremamente complicado, tendo em conta a patologia de base dos doentes (ex. hipertensão portal, coagulopatia) e, como tal, condicionar uma maior variabilidade no tempo necessário para a sua realização.

Durante a fase anepática, que compreende o período de tempo entre a remoção física do fígado nativo e que termina com o início da recirculação sanguínea no enxerto hepático, pode ser acompanhada de graves alterações hemodinâmicas, hematológicas e metabólicas [37]. Nesta fase, o fluxo sanguíneo pela veia porta e eventualmente pela veia cava encontra-se obstruído, condicionando hipertensão quer esplâncnica quer do sistema venoso sistémico. Como tal, para manter a estabilidade hemodinâmica, é prática comum a realização de um shunt entre a veia porta e a veia cava infra-hepática do hospedeiro, promovendo o restabelecimento do retorno venoso central. Caso não se efetue, por opção do cirurgião ou por envolvimento da veia cava, haverá necessidade de manter um suporte anestésico cuidado, com eventual administração de fármacos vasopressores e expansores do volume, de modo a minorar o impacto destas alterações.

As anastomoses vasculares só começam a ser realizadas quando o campo cirúrgico se encontra preparado para receber o órgão, pelo que só nessa fase é que o implante é retirado da solução de preservação a 4 °C. Classicamente inicia-se com a anastomose da veia cava supra-hepática e posteriormente seguem-se por ordem sequencial a anastomose da veia cava infra-hepática, da veia porta, da artéria hepática e finalmente da via biliar principal, embora esta ordem possa variar tendo em conta a preferência do cirurgião ou a anatomia e as circunstâncias fisiológicas de cada doente.

Em alternativa, a técnica piggyback consiste na anastomose entre a veia cava supra-hepática do dador à confluência das veias hepáticas do recetor. Nesta técnica a veia

cava infra-hepática do enxerto é suturada, limitando a extensão da dissecação retroperitoneal e eliminando a necessidade de realizar um *bypass* veno-venoso, contribuindo deste modo para a diminuição da fase anepática, preservando a estabilidade cardiovascular por manutenção do fluxo venocava. A técnica de piggyback é necessária quando não dispomos da veia cava do dador, como acontece no transplante com dador vivo ou na técnica de partição hepática (técnica de Split) [38-40].

A técnica de Split baseia-se no facto do fígado ser composto por vários segmentos anatómicos (I-VIII), pois cada uma dessas unidades tem irrigação sanguínea, drenagem venosa e biliar tornando possível a partição hepática. Por norma, o Split é utilizado em pacientes com idade pediátrica (incluindo os segmentos II e III ou os segmentos II, III e IV) ou em adultos (incluindo os segmentos I, V, VI, VII e VIII ou os segmentos I, IV, V, VI, VII e VIII). A partição hepática permitiu a realização de transplantes hepáticos a partir de fígados provenientes de dadores vivos, sendo mais comum o transplante de adulto para criança. A transplantação de fígado de dador vivo entre adultos é mais limitada, pois o lobo esquerdo pode ser insuficiente, podendo levar à falência hepática pós-transplante [41, 42].

Complicações da transplantação hepática

Complicações precoces

Imediatamente após a realização de um transplante hepático é possível aferir se o órgão está funcionando através da monitorização dos parâmetros de coagulação, da produção de biliar e da *clearance* de lactato [43, 44]. A monitorização da função hepática é fulcral para o sucesso do transplante, pois de acordo com a literatura, 2 % dos transplantes hepáticos não são funcionantes (disfunção hepática primária), processo que pode ser fatal a menos que se realize um retransplante.

A monitorização de possíveis complicações vasculares relacionadas com a trombose venosa e/ou arterial, é realizada com controlo seriado por ecografia com Doppler, para sua deteção precoce de forma a evitar a perda do enxerto [45, 46].

A estenose dos ductos biliares ou as fugas biliares podem surgir precocemente. Neste período, a estenose dos ductos biliares é normalmente autolimitada, estando

maioritariamente relacionada com processos inflamatórios ou resultar do edema da anastomose [47, 48].

Outras complicações precoces estão relacionadas com a hemorragia e com a produção inadequada de fatores de coagulação (*poor inicial function*) [49-51].

Complicações tardias

As complicações tardias da transplantação hepática estão relacionadas com a rejeição do enxerto, com a terapêutica imunossupressora e com a possibilidade de recidiva da doença hepática [52].

Tipicamente os episódios de rejeição são assintomáticos, cuja suspeita tem por base alterações das provas hepáticas, o que obriga à realização de biópsias hepáticas para confirmação do diagnóstico. Nestes casos, ao confirmar-se a rejeição do órgão, pode aumentar-se a terapêutica imunossupressora ou nos casos mais severos haver necessidade de administrar corticosteroides [53, 54].

As principais complicações da terapêutica imunossupressora estão relacionadas com o aumento da suscetibilidade às infeções, com alterações no sistema cardiovascular e com o eventual aumento da incidência de outros tumores primários (ex. cólon, mama...), facto que não deve ser descurado no seguimento destes doentes [55].

A taxa de recidiva após transplante por hepatite C é sobejamente conhecida. Apesar de raro, qualquer outra condição que leve à realização de transplante hepático pode recidivar e obrigar à realização de novo transplante [56-58].

Alargamento dos critérios dos dadores

Em Portugal, após um período de decréscimo do número de dadores e de transplantes hepáticos efetuados, assiste-se desde 2012 a um aumento progressivo destes dados. Apesar dessa melhoria, continua a registar-se uma discrepância entre o número de doentes a aguardar por um órgão e a sua disponibilidade, facto que representa na atualidade um dos maiores obstáculos à transplantação. Por forma a diminuir este hiato entre as necessidades e a disponibilidade de órgãos, passaram a utilizar-se órgãos previamente considerados inadequados para transplantação. Como tal, houve necessidade de estender os critérios de inclusão dos órgãos disponíveis para

transplantação, incluindo órgãos de dadores com idade mais avançada, com isquemia fria prolongada, dadores após paragem cardíaca e relativamente ao órgão, a utilização de fígados com graus variáveis de esteatose. Este alargamento dos critérios de inclusão foi de tal maneira expressivo, que atualmente representa nalguns centros, 2/3 da totalidade dos fígados disponíveis para transplante [54, 59].

De salientar que a esteatose hepática, especialmente a macrovesicular, é um fator de risco major na cirurgia hepática. Encontra-se associada a um aumento do risco de falência do fígado transplantado, condicionando o sucesso da transplantação. Níveis de esteatose macrovesicular superiores a 30 %, condicionam uma redução da sobrevivência do enxerto durante o primeiro ano, estimando-se que seja responsável pela rejeição de 25 % dos fígados [60-62].

Soluções de preservação

Desde os anos 80, a colheita multiorgânica de um único dador tornou-se prática habitual, permitindo a padronização das técnicas de colheita. Neste período, o desenvolvimento de soluções de preservação foi fundamental para o sucesso da transplantação hepática, permitindo o armazenamento do órgão por períodos que podiam variar entre as 12 e as 18 h, tornando possível a partilha de órgãos entre diferentes regiões [63].

Existem diversas soluções de preservação hepática, sendo de salientar: a solução da Universidade de Wisconsin, a solução de histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK) e a solução de Celsior (Tabela 4) [64, 65].

Componentes (mMol/L)	UW	HTK	Celsior
Sódio	135	15	100
Potássio	35	9	15
Magnésio	5	4	13
Cálcio	2,5	0,015	0,25
Sulfato	5	-	-
Lactobionato	100	-	80
Rafinose	30	-	-
Manitol	-	30	60
HES (g/L)	50	-	-
Fosfato	25	-	-
Histidina	-	200	30
Glutaciona	3	-	3
Alopurinol	1	-	-
Triptofano	-	2	-
Adenosina	5	-	-
Glutamato	-	-	20
Insulina (U/L)	100	-	-
Dexametasona (mg/L)	8	-	-
Bactrim (mL/L)	0,5	-	-
pH	7,4 ± 0,5	7,4 -7,45	7,4 ± 0,2
Osmolaridade (mOsm/L)	330	310	320

TABELA 4- COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO UW, HTK E CELSIOR

A solução UW foi desenvolvida na década de 1980 tendo sido utilizada para preservação do fígado, rim e pâncreas. A base desta solução é complexa, pois é constituída por múltiplos compostos, à qual se associaram três moléculas (lactobionato, rafinose e hidroxietilamida) com o intuito de prevenir o edema dos tecidos e modelar o fluxo vascular [66, 67].

A solução de HTK é eficaz na preservação do fígado e do rim. Apresenta baixas concentrações de sódio, de potássio e de magnésio e não contém colóides [68-70]. A solução de Celsior é semelhante à solução de HTK, tendo sido originalmente desenvolvida para a preservação do coração. Apesar de ter especificidades semelhantes à solução UW, a composição eletrolítica do Celsior mimetiza o meio extracelular contrariamente à solução de UW que reproduz o meio intracelular [71]. A solução de Celsior contém lactobionato e manitol que, por serem macromoléculas,

permitem a manutenção do balanço osmótico e prevenção do edema celular, fenómenos que ocorrem durante o armazenamento do órgão no gelo. Esta solução, incorpora histidina e glutamato que funcionam como substrato energético fundamental para o metabolismo celular. A baixa viscosidade associada ao Celsior quando comparada com a solução UW, confere uma vantagem pelo menos teórica, dado que para além de permitir uma melhor perfusão da solução no órgão, no final da preservação é facilmente eliminada [72].

Os diferentes componentes das soluções de preservação visam proteger ou minimizar o impacto induzido pelo processo de isquemia/reperfusão no enxerto hepático (Tabela 5).

Estratégias de proteção	Função	Agentes químicos (Sol. Preservação)
Prevenção do edema intracelular	Macromoléculas permeantes	Lactobionato (UW, Celsior), rafinose (UW), Manitol (Celsior, HTK)
Prevenção do edema intracelular	Coloides permeantes de membrana	HES (UW)
Manutenção do pH fisiológico	Tampões	Fosfato (UW), Histidina (HTL, Celsior)
Redução das lesões oxidativas induzida pelos radicais livres	Antioxidantes	Glutationa (UW, Celsior); Alopurinol (UW);
Preservação do metabolismo energético celular	Substratos precursores do metabolismo energético	Adenosina (UW), Histidina (HTK, Celsior), Glutamato (Celsior)
Manutenção da integridade celular	Preservação da membrana celular	Dexametasona (UW), Histidina (HTK, Celsior), Triptofano (HTK)

TABELA 5- ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÃO E FUNÇÃO BIOQUÍMICA DOS COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO

Habitualmente a preservação do fígado é estática, onde o órgão é mantido em soluções de preservação, a baixas temperaturas (2 – 4 °C) devidamente condicionado no gelo. A

instilação das soluções de preservação ocorre após um período de dissecação e colocação de cânulas na veia porta/veia mesentérica inferior e na aorta. Por norma, a instilação de quatro litros de solução de preservação pela aorta e de dois litros pelo sistema porta através da veia mesentérica inferior, são suficientes para permitir uma adequada refrigeração do órgão. A hepatectomia do enxerto termina quando o fígado fica gelado adquirindo uma tonalidade mais esbranquiçada, como resultado da completa perfusão das soluções de preservação [73].

Na atualidade a preservação hepática dinâmica encontra-se em investigação clínica, embora dados recentes do primeiro estudo randomizado demonstrem que se trata de um processo seguro e que poderá contribuir para um incremento do tempo de preservação do fígado [74]. Este processo de preservação consiste na aplicação de uma máquina que permite preservar e manter a perfusão do órgão ex vivo, utilizando diversas soluções de preservação, sob condições térmicas definidas (hipotermia ou normotermia). Os desenvolvimentos da preservação dinâmica poderão conduzir a alterações na forma como os órgãos são perfundidos, preservados e transportados [75, 76].

Histologia funcional do fígado

O fígado é composto por inúmeras unidades básicas denominadas por lóbulos hepáticos, com uma estrutura semelhante a um hexágono. Em cada vértice, encontra-se uma estrutura denominada por espaço porta, envolvida por tecido conjuntivo e constituída por uma arteríola (ramo terminal da artéria hepática), por uma vénula (ramo da veia porta) e por um ramo do ducto biliar. O sangue ao chegar aos espaços porta vai convergir para uma vénula hepática terminal (centrolobular) que posteriormente drena para a veia hepática (Figura 4). Neste trajeto, o sangue converge através dos sinusóides hepáticos, contactando através do espaço de Disse, com a superfície dos hepatócitos (Figura 5).

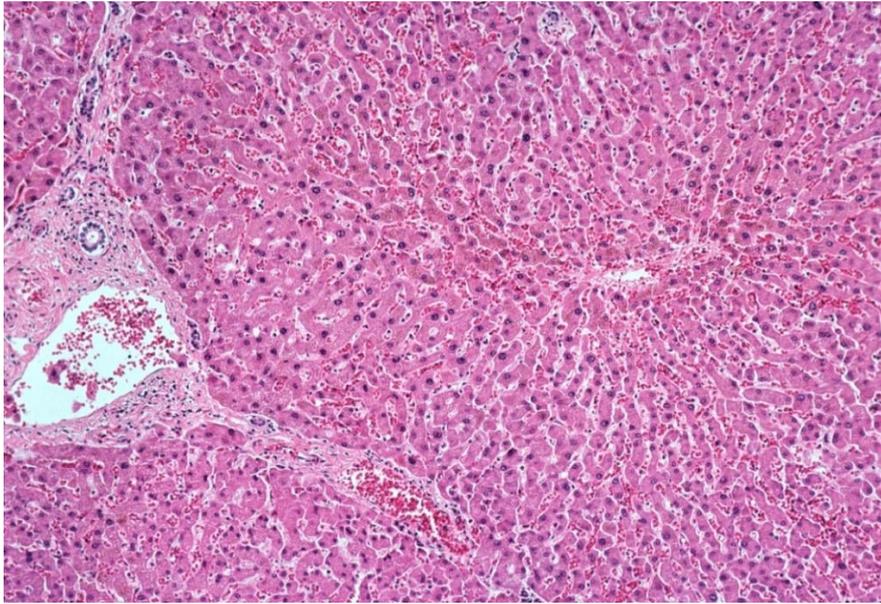


FIGURA 4- HISTOLOGIA DO LÓBULO HEPÁTICO NORMAL

Presença do espaço porta, sinusóides hepáticos e veia hepática central (H&E).
(Adaptado de Pathology Education Informational Resource (PEIR) Digital Library)

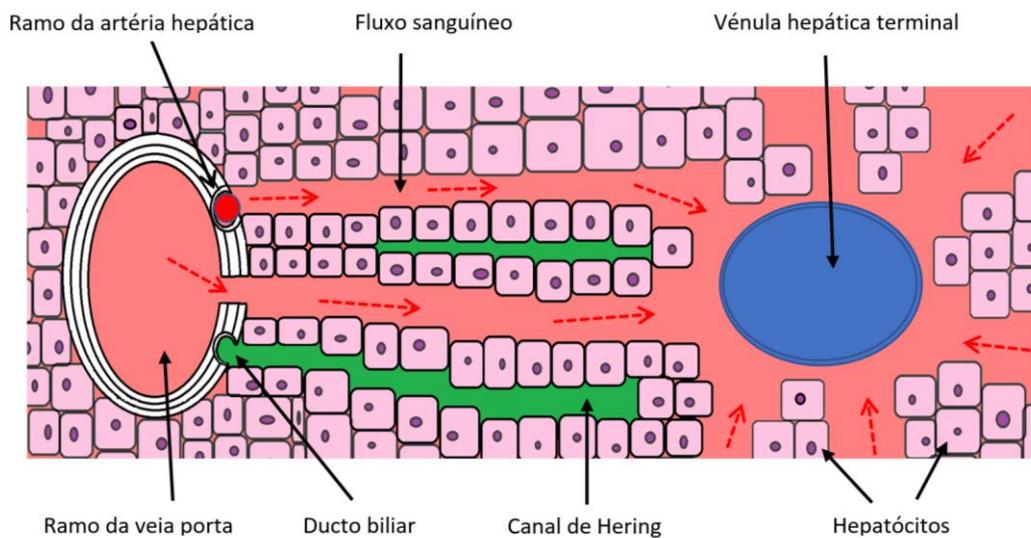


FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESPAÇO PORTA TÍPICO

Passagem do fluxo sanguíneo pelos sinusóides hepáticos em direção à vénula hepática terminal. Presença dos ductos coletores biliares.

Entre o espaço porta e a vénula hepática terminal encontram-se as células hepáticas propriamente ditas. Estas podem ser classificadas em 3 categorias: as células do parênquima hepático onde se incluem os hepatócitos e as células epiteliais dos ductos

biliares; as células sinusoidais que compreendem as células endoteliais sinusoidais hepáticas e as células de Kupffer; e finalmente as células peri-sinusoidais constituídas pelas células estreladas hepáticas (células de Ito) e pelas células de pit (Figura 6) [77, 78].

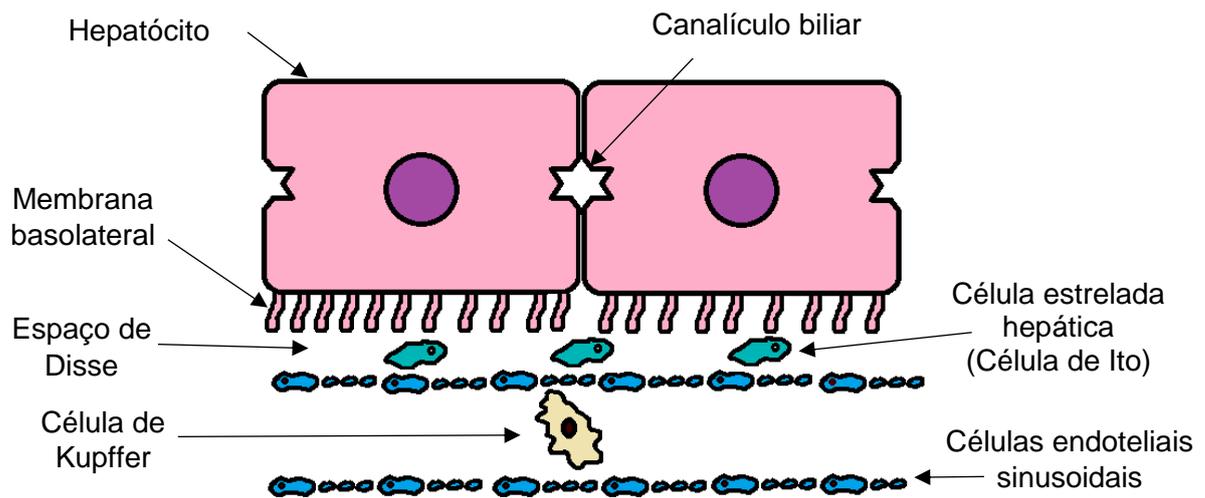


FIGURA 6- ESQUEMA REPRESENTATIVO DA RELAÇÃO ESPACIAL ENTRE AS DIFERENTES CÉLULAS DO FÍGADO.

Os sinusóides hepáticos são capilares sanguíneos fenestrados, localizados entre as placas de hepatócitos, que recebem sangue oxigenado da artéria hepática e sangue rico em nutrientes da veia porta. As células endoteliais sinusoidais são fenestradas sem membrana basal. O plasma sinusoidal entra em contacto com os hepatócitos no espaço de Disse. As células estreladas (Ito) encontram-se entre as células endoteliais e os hepatócitos. As células de Kupffer localizam-se no lúmen sinusoidal estão em contacto direto com as células endoteliais. Os canalículos biliares são minúsculos canais intercelulares, formados pelo contacto da membrana plasmática entre dois hepatócitos adjacentes, e que transportam bÍlis em direção aos ductos biliares. As células de pit não estão representadas.

No adulto, os hepatócitos representam cerca de 60 % das células hepáticas, o que corresponde a 78 % do volume hepático. Os hepatócitos são células poliédricas grandes que medem aproximadamente 20 a 30 μm de diâmetro. São constituídos por grandes núcleos arredondados com cromatina dispersa na periferia e nucléolos proeminentes. O citoplasma é fortemente eosinófilo devido à elevada quantidade de mitocôndrias, apresentando uma fina granulação basófila como resultado da enorme quantidade de ribossomas livres e retículo endoplasmático [79].

O citoplasma é amplo, cuja aparência varia com o estado nutricional do indivíduo, pois quando este se encontra bem nutrido, o citoplasma tem a capacidade de armazenar quantidades significativas de lípidos e de glicogénio [80].

A vascularização hepática é efetuada pela veia porta e pela artéria hepática. A veia porta é responsável por 70 a 80 % do aporte sanguíneo, que resulta da drenagem venosa do estômago, intestino, baço e pâncreas, sendo rico em nutrientes, mas pobre em oxigénio. Contrariamente, o sangue proveniente da artéria hepática é rico em oxigénio.

O fígado representa 2,5 % do peso corporal total e recebe aproximadamente 25 % do débito cardíaco. Estima-se que o volume sanguíneo do fígado seja de 25-30 mL por 100 gr de tecido hepático, que representa 10 a 15 % do total do volume sanguíneo corporal. A maioria do volume sanguíneo (60 %) encontra-se nos sinusóides hepáticos, enquanto os restantes 40 % distribuem-se pelos grandes vasos (artéria hepática, veia porta e veias hepáticas) [81].

Mitocôndria: considerações gerais e estrutura mitocondrial

As mitocôndrias (*mitos*, filamento e *condria*, partícula) são organelos celulares, presentes no citoplasma das células eucarióticas e que habitualmente tem uma forma alongada. A principal função das mitocôndrias é a produção gradual de energia a partir das moléculas de ácidos gordos e de glicose provenientes dos alimentos, resultando a produção de ATP e de calor [82, 83].

A energia utilizada pelas células resulta da progressiva quebra de ligações covalentes de moléculas de compostos orgânicos. As células não utilizam diretamente a energia proveniente dos hidratos de carbono e das gorduras, usam um composto intermediário, que resulta da energia contida nas moléculas de glicose e de ácidos gordos, denominado por adenosina trifosfato (ATP). O ATP tem duas ligações ricas em energia (~) e quando uma delas se quebra liberta aproximadamente 10 quilocalorias por mol (Figura 7).

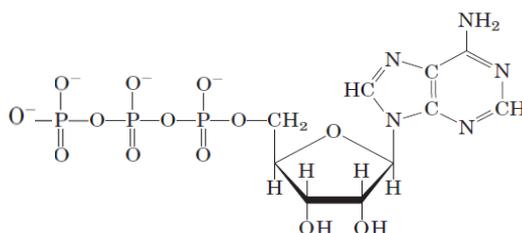


FIGURA 7- FÓRMULA DA ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP)

O ATP é um composto instável, embora facilmente utilizado pela célula, como consequência da elevada abundância da enzima responsável pela quebra da molécula de ATP (ATPase). Normalmente, apenas uma dessas ligações é quebrada, segundo a equação:



O processo de oxidação lenta dos nutrientes, que conduz ao consumo de O_2 , à libertação de energia e à produção de água e CO_2 denomina-se por respiração celular. A glicólise é o processo básico da respiração celular, que pode expressar-se pela seguinte equação química:



As mitocôndrias têm um diâmetro aproximado de 0,5 até 10 μm , e são constituídas por duas unidades de membrana, que envolvem um espaço interno denominado por matriz mitocondrial. As membranas mitocondriais são formadas por uma dupla camada de fosfolípidos contendo pequenas quantidades de outros lípidos, estando separadas pelo espaço intermembranoso. A membrana mitocondrial externa é lisa, tem elevado conteúdo de colesterol e é constituída por proteínas intercaladas ao longo da membrana (porinas) que formam canais com menos de 1 nm, tornando esta membrana muito permeável à passagem de moléculas com baixo peso molecular (< 5 kDa).

A membrana interna é pobre em colesterol e tem elevado conteúdo de cardiolipina ao contrário da membrana mitocondrial externa. Este fosfolípido contribui para dificultar a

passagem de partículas com carga elétrica através da membrana mitocondrial interna, facto funcionalmente relevante, pois uma elevada concentração de iões na matriz mitocondrial, iria alterar o gradiente que gera o fluxo de protões, resultando uma menor produção de ATP.

Os fosfolípidos das membranas mitocondriais não são sintetizados nas mitocôndrias, mas no retículo endoplasmático liso, sendo transferidas para as mitocôndrias por proteínas transportadoras especiais.

A membrana interna apresenta invaginações, denominadas por cristas, que permitem aumentar bastante a sua superfície. Na face interna da membrana mitocondrial interna, existem pequenas partículas denominadas por corpúsculos elementares, que medem 10 nm de diâmetro onde se gera ATP e calor. No interior das mitocôndrias encontra-se uma substância finamente granular denominada por matriz mitocondrial. Esta matriz contém filamentos de DNA e ribossomas com diâmetro inferior aos observados no citoplasma (Figura 8) [84].

As mitocôndrias, apesar da sua distribuição por todo o citoplasma, mudam frequentemente de posição aproximando-se dos locais citoplasmáticos onde existe maior consumo de energia. De acordo com o tipo de célula e o estado funcional, existe alguma variabilidade na estrutura mitocondrial, quer na quantidade de cristas mitocondriais quer na densidade da matriz mitocondrial.

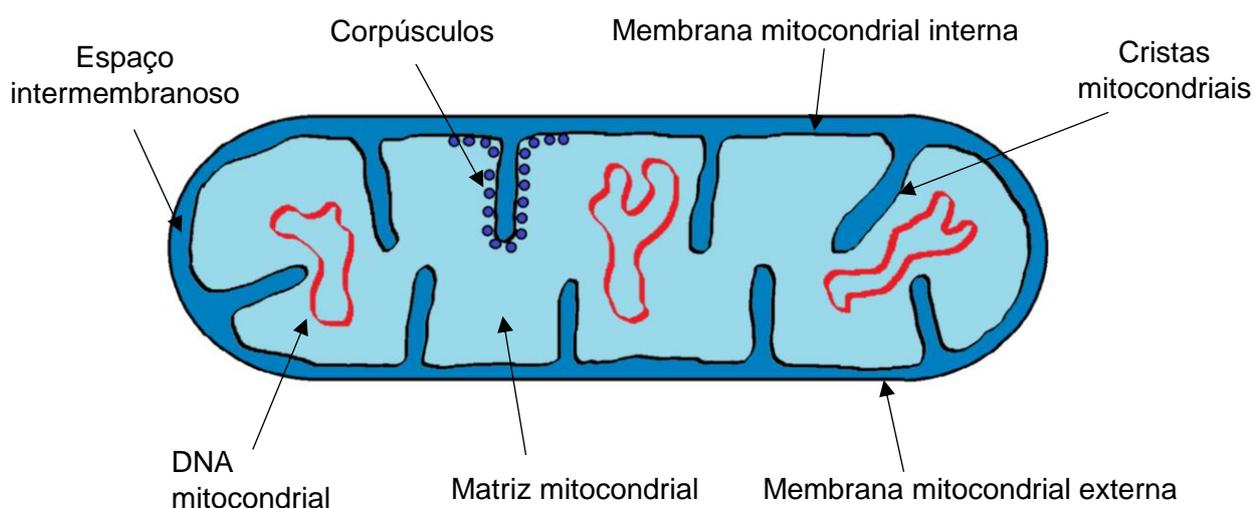


FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS ELEMENTOS DA ESTRUTURA MITOCONDRIAL

A matriz mitocondrial é formada por um complexo concentrado enzimático, onde se incluem as enzimas do ciclo do ácido cítrico (ciclo de *Krebs*), da β -oxidação dos ácidos gordos e da replicação, transcrição e tradução do DNA mitocondrial [85].

A membrana mitocondrial interna é constituída por um elevado conteúdo proteico, sendo de destacar os corpúsculos elementares com atividade de ATP-sintetase, as enzimas e proteínas que constituem a cadeia de transporte de eletrões e inúmeras proteínas que fazem parte de múltiplos sistemas de transporte ativo.

Em 1966, foi descoberto o DNA mitocondrial (mtDNA), embora só em 1981 tenha sido completamente sequenciado. A mitocôndria apesar de ter o seu próprio genoma, é um organelo semiautónomo, na medida em que apesar de ter capacidade para se multiplicar de modo independente da divisão celular, depende para o seu funcionamento de proteínas codificadas nos genes do núcleo. A maior parte das proteínas mitocondriais são sintetizadas em polirribossomas livres no citoplasma, sendo posteriormente transferidas para o interior das mitocôndrias, num processo que é regulado por proteínas do grupo das moléculas chaperones.

Contrariamente ao DNA nuclear, o mtDNA é de duplo filamento circular e representa apenas do 1 % do DNA total da célula. O mtDNA é herdado exclusivamente da mãe, é constituído por 16.539 pares de bases nitrogenadas, não contém intrões e apresenta 37 genes que codificam 13 proteínas essenciais para a cadeia respiratória, 22 tRNAs (RNA transferência), 2 rRNAs (RNA ribossómico) e 13 mRNAs (RNA mensageiro) [86, 87].

As duas cadeias do mtDNA têm características diferentes e são divididas em cadeia pesada e cadeia leve. Os mamíferos apresentam um elevado número de cópias de DNA mitocondrial, e comparativamente com o DNA nuclear tem maior suscetibilidade em acumular mutações, devido à maior proximidade com a cadeia respiratória, local onde são produzidos radicais livres. A avaliação das mutações do genoma mitocondrial é extremamente difícil, dado que estas podem afetar a totalidade ou apenas parte das cópias, o que leva a que o fenótipo (expressão clínica) da mutação mitocondrial dependa da quantidade de DNA mitocondrial mutante [88].

Cadeia respiratória, fosforilação oxidativa e produção de energia

Nas células eucarióticas, a degradação da glicose (glicólise) ocorre no citoplasma. A glicólise, também conhecida como via de Ebden-Meyerhof, é um processo comum a todos os seres vivos, é a primeira via metabólica da molécula de glicose e de outras

hexoses. De acordo com a utilização ou não de oxigênio, a glicólise pode ocorrer em condições de aerobiose ou de anaerobiose.

A glicólise anaeróbia promove transformações graduais de uma molécula de glicose, sem consumo de oxigênio, gerando duas moléculas de piruvato e libertando energia que é armazenada em duas moléculas de ATP. Este processo é pouco eficiente pois das 690 kcal/mol presentes na glicose, apenas 20 kcal são aproveitadas [89].

Em condições de aerobiose, o metabolismo da glicose continua com as restantes vias metabólicas produtoras de energia (ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória), que ocorrem no interior das mitocôndrias, pelo que é essencial que as mitocôndrias sejam funcionais.

Na glicólise aeróbia, para além de 2 moles de ATP por cada mol de glicose obtidos pela via anaeróbia, são produzidas mais 36 moles de ATP como resultado da fosforilação oxidativa (Figura 9).

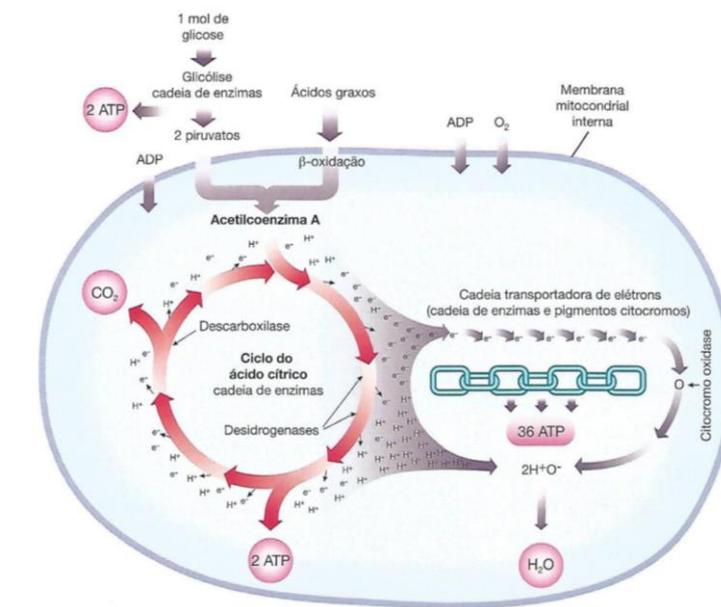


FIGURA 9- ILUSTRAÇÃO DOS PRINCIPAIS PROCESSOS QUE OCORREM NA RESPIRAÇÃO CELULAR AERÓBIA.

Inicialmente ocorre a entrada de acetil-CoA na matrix mitocondrial resultando a produção de elétrons, prótons, CO₂ e 2 moles de ATP. Os elétrons percorrem a cadeia respiratória mitocondrial produzindo 36 moles de ATP. De notar que no citoplasma, 1 mole de glicose produz 2 moles de ATP e piruvato (Adaptado de Biologia Celular e Molecular, Junqueira e Carneiro, 9ª edição)

A fosforilação oxidativa é um processo metabólico no qual proteínas localizadas na membrana interna da mitocôndria, funcionam como enzimas ou transportadores, que catalisam a formação de energia por um processo quimiosmótico. De um modo mais

detalhado, o piruvato (derivado da glicólise) e os ácidos gordos atravessam a membrana mitocondrial até à matrix, onde geram acetato que ao ligar-se à coenzima A leva à formação de acetil-CoA. O acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico, que após uma sequência cíclica de reações enzimáticas mediadas por desidrogenases leva a produção de ATP, eletrões e prótons. Este processo tem um rendimento energético baixo pois apenas promove a síntese de duas moles de ATP por cada mole de glicose consumida.

A cadeia transportadora de eletrões é constituída por enzimas e compostos não enzimáticos, cuja principal função é o transporte de eletrões, que libertam progressivamente essa energia para três lugares específicos na cadeia em que ocorre a síntese de ATP.

Os eletrões produzidos no ciclo do ácido cítrico são captados por moléculas complexas como o NAD (nicotinamida-adenina-dinucleótido), o FAD (flavina adenina dinucleótido) e os citocromos que funcionam como transportadores de eletrões num processo de oxidação/redução. Por sua vez o hidrogénio produzido como resultado das reações será libertado da matrix mitocondrial sob a forma de prótons [90].

A componente exergónica do processo advém da oxidação do NADH pelo oxigénio, devida à diferença de potencial de oxidação/redução do par redox O_2/H_2O ($E^{\circ} = +0,815$ volt) em relação ao par $NADH/NAD^+$ ($E^{\circ} = -0,315$ volt), conduzindo a que os eletrões se desloquem do NADH para o O_2 [91].

Este conjunto de enzimas localizam-se na membrana mitocondrial interna, e são designados por complexos I, II, III, IV e V, constituindo a cadeia de transporte de eletrões (Figura 10) [92].

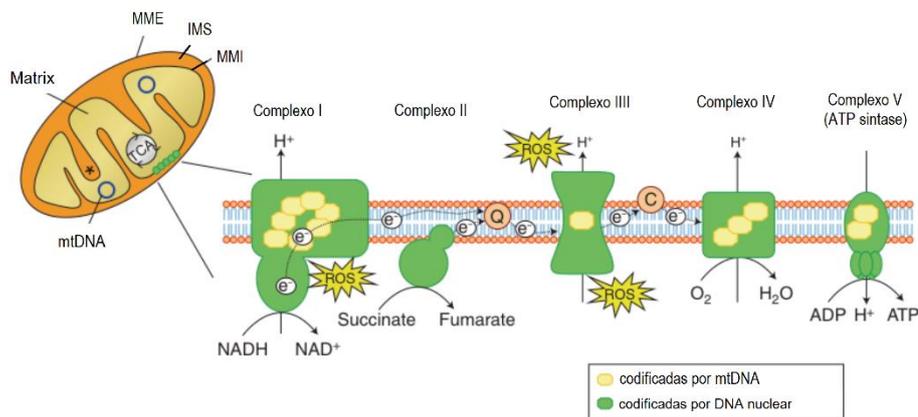


FIGURA 10- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS 5 COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.

Complexo I (NADH desidrogenase); Complexo II (Succinato desidrogenase); Complexo III (Citocromo *c* redutase); Complexo IV (Citocromo *c* oxidase); Complexo V (ATP sintase) (Adaptado de Perier and Vila, 2012)

No início da cadeia respiratória, ocorre a transferência de elétrons para a ubiquinona (coenzima Q10) que é catalisada pelo dador NADH no complexo I e pelo succinato no complexo II.

O complexo I, também conhecido como NADH desidrogenase, é uma enzima de grandes dimensões, possui 43 subunidades e uma massa molecular de 850 kDa, formada por proteínas codificadas quer nos genes do DNA nuclear quer no genoma mitocondrial.

A reação catalisada por esta enzima consiste na redução da coenzima Q10 por dois elétrons provenientes do NADH. Assim, à medida que os elétrons passam através deste complexo, quatro prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar [93].

O complexo II, constituído por quatro subunidades proteicas e um cofator dinucleótido de flavina-adenina (FAD), é onde ocorre a oxidação do succinato a fumarato. No complexo II não existe transporte de prótons através da membrana, nem interferência na variação do fluxo de prótons, provavelmente relacionado com o facto de esta reação ser menos exergónica comparativamente com a oxidação do NADH [94].

O complexo III, habitualmente conhecido como citocromo *c* redutase, é uma enzima onde cada subunidade é constituída por um complexo de 11 proteínas, um centro [2Fe-2S] e três citocromos (um citocromo *c*₁ e dois citocromos *b*). O complexo III recebe elétrons de 2 moléculas de ubiquinol (ubiquinona reduzida), o que equivale a 4 elétrons,

embora uma dessas moléculas de ubiquinona, agora oxidada, vá captar 2 elétrons. Este complexo tem uma característica particular, pois só aceita 1 elétron, o que significa que para realizar a sua função necessita que ocorra a oxidação de uma molécula de ubiquinol e a redução de duas moléculas de citocromo c, ou seja, necessita de transferir 2 elétrons de uma molécula de ubiquinol para duas moléculas de citocromo c.

O complexo IV, denominado por citocromo c oxidase, é constituído por 13 subunidades, dois grupos heme e diversos outros cofatores metálicos (ex. iões de cobre, magnésio e zinco). Nesta enzima, ocorre a oxidação do citocromo c, ocorrendo a transferência de elétrons para o oxigénio, ao mesmo tempo que os prótons são bombeados através da membrana. Como consequência da combinação do oxigénio com carga elétrica negativa com os prótons da matrix mitocondrial, ocorre a formação de água (Figura 11) [95, 96].

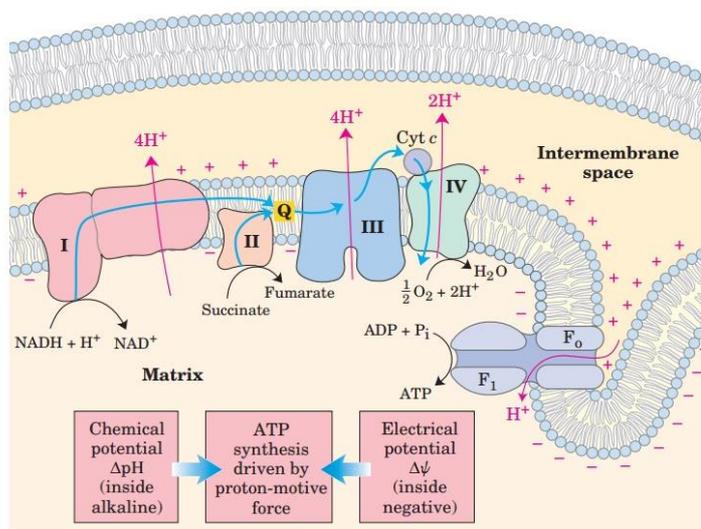


FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO DA TEORIA QUIMIOSMÓTICA MOSTRANDO O FLUXO DE ELETRÕES AO LONGO DA CADEIA RESPIRATÓRIA.

Neste processo ocorre a transferência de prótons e é gerado um gradiente elétrico entre a matrix mitocondrial e o espaço intermembranoso. A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, que reentram na matrix mitocondrial apenas por canais específicos (F_0) (Adaptado de Lehninger Principles of Biochemistry, cap.19).

O complexo V, também designado por ATP sintase é a enzima final da cadeia transportadora de elétrons. A ATP sintase é um complexo proteico de grandes dimensões, contém 16 subunidades e uma massa de aproximadamente 600 kDa. A parte da enzima envolvida na membrana é designada F_0 e contém um anel de subunidades c e um canal de prótons. A síntese de ATP, ocorre numa estrutura

denominada por F_1 , cujo eixo e extremidade tem uma forma esférica. O F_1 é formado por seis proteínas de dois tipos distintos (três subunidades α e três subunidades β) e uma proteína no eixo (subunidade γ) que contacta com as subunidades α e β [97].

A atividade de fosforilação da F_1F_0 ATP sintase é reversível, pois baseia-se num equilíbrio químico dependente da força gerada pelo gradiente de prótons. A força motriz gerada pelos prótons ao longo da membrana mitocondrial interna, leva à passagem de prótons pela região F_0 da ATP sintase, desencadeando a rotação das subunidades c . O anel formado pelas subunidades c encontra-se ligado ao eixo que roda no meio das subunidades $\alpha_3\beta_3$ da F_1 , condicionando que os três centros catalíticos de ligação de nucleótidos, passem por uma série de mudanças de conformação, que conduzem à síntese do ATP [98].

Se a força motriz for insuficiente, o ATP vai ser hidrolisado conduzindo à eliminação de prótons para fora da matrix mitocondrial. À medida que se eleva a força gerada pelos prótons, aumenta o fluxo de prótons a favor do gradiente de concentração, favorecendo a produção de ATP a partir do ADP [99].

As subunidades α e β conseguem ligar nucleótidos, mas apenas a subunidade β catalisa a reação de síntese do ATP. Devido à existência de um braço lateral que se estende ao longo de F_1 e que penetra na membrana promovendo a ligação entre as subunidades α e β à base da enzima, a região F_1 não sofre qualquer movimento rotacional. O movimento da subunidade γ fornece a energia necessária para que ocorra a modificação cíclica dos centros ativos das subunidades β , que ao sofrerem alterações permitem a produção e libertação de ATP [100].

Neste processo resulta um fluxo constante de ADP que é transferido do citoplasma para o interior da mitocôndria, sendo posteriormente transformado em ATP. No sentido inverso, o ATP ao ser formado desloca-se para o citoplasma.

O fluxo retrógrado que resulta da passagem de íons de H^+ através dos corpúsculos elementares, gera energia que é parcialmente acumulada (50 %) como energia química (ATP) e a restante é dissipada na forma de calor. A proteína termogenina (*uncoupling protein*), localizada na membrana mitocondrial interna, pode funcionar como mecanismo regulador da quantidade de energia proveniente dos nutrientes que será utilizada na produção de calor. Neste processo o fluxo retrógrado de prótons dissipa 100 % da sua energia como calor, não havendo lugar à síntese de ATP [101].

Permeabilidade de transição mitocondrial

A membrana mitocondrial interna é virtualmente impermeável a quase todos os íons e moléculas polares. Na membrana mitocondrial interna existem canais específicos, cuja abertura se encontra estritamente regulada de modo a prevenir a dissipação do potencial de membrana e do gradiente de prótons. Existem certas circunstâncias, como por exemplo a acumulação de cálcio, especialmente quando acompanhada de *stress* oxidativo, de concentrações elevadas de fosfato e da depleção de nucleótidos de adenina, que podem induzir um aumento repentino da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, denominada por permeabilidade de transição mitocondrial (MPT, *mitochondrial permeability transition*), e que permite a passagem de solutos com massa molecular até 1500 Da. Na atualidade sabe-se que a permeabilidade de membrana está relacionada com a abertura de um canal proteico inespecífico de elevada dimensão, dependente do cálcio, induzido por voltagem e sensível à ciclosporina A (CsA) denominado por poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP). A abertura do poro promove a entrada de água na tentativa de compensar o potencial osmótico, levando a um aumento do volume da matriz mitocondrial [102]. Este intumescimento mitocondrial leva à quebra da membrana interna, condicionando a despolarização mitocondrial com a consequente libertação de cálcio [103]. O mPTP está envolvido em processos onde a disponibilidade de oxigénio é baixa, como por exemplo nos processos de isquemia/reperfusão, tendo sido comprovado que a inibição de poro por via farmacológica ou genética confere efeito de prevenção da disfunção mitocondrial [104]. No poro de MPT podemos encontrar dois estados de condutância: alta e baixa condutância. O estado de alta condutância, é irreversível, e surge como consequência da acumulação de cálcio na matrix mitocondrial e subsequente aumento do pH que contribui para a libertação de fatores pró-apoptóticos (citocromo c e pró-caspases). Por sua vez, o estado de baixa condutância, é reversível, e encontra-se envolvido na libertação de cálcio para o exterior da mitocôndria. Deste modo, concentrações elevadas de cálcio, depleção de ATP, aumento dos níveis da proteína Bax, despolarização mitocondrial e o *stress* oxidativo são condições patofisiológicas indutoras de MPT. A maior consequência da indução da permeabilidade de membrana mitocondrial é a inibição da fosforilação oxidativa que poderá conduzir à morte celular por necrose e à libertação de fatores pró-apoptóticos relacionado com mecanismos de apoptose.

Homeostase do cálcio

Na maioria das células, a concentração plasmática de cálcio livre é regulada, sendo um processo vital para a fisiologia celular. Funciona como agente de sinalização intracelular nos processos biológicos de aprendizagem, memorização, fertilidade, proliferação, desenvolvimento, entre outros.

A dinâmica intracelular do Ca^{2+} , só é possível graças à existência de várias proteínas localizadas em diferentes regiões celulares, que trabalham de forma coordenada. Daí o papel da membrana mitocondrial interna, da membrana plasmática e do retículo endoplasmático na regulação da concentração citoplasmática de cálcio pois têm um sistema transportador específico.

Quando a concentração de cálcio é mais elevada, a mitocôndria capta esse íon devido a uma interação com canais iônicos entre a membrana citoplasmática e o retículo endoplasmático [105]. O aumento da concentração de Ca^{2+} mitocondrial funciona como sinal na regulação da atividade mitocondrial pois as enzimas intramitocondriais envolvidas no metabolismo energético são ativadas pela sinalização do cálcio, estimulando a ativação do ciclo do ácido cítrico, a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP [106, 107].

A entrada do cálcio para a matrix mitocondrial é promovido pelo gradiente eletroquímico estabelecido e mantido pela cadeia respiratória. Este influxo é mediado por sistema uniporte (MCU, *mitochondrial Ca^{2+} uniporter*) que é ativado apenas pela concentração de cálcio externo, não envolvendo a hidrólise de ATP ou o co-transporte de outros íons ou moléculas. De acordo com Sparagna et al. a entrada de cálcio é mais eficaz quando existem picos de concentração de cálcio do que quando as concentrações cálcio são constantes [108].

Foi proposto outro mecanismo que permite a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, denominado por RaM (*rapid calcium uptake mode*), no qual a condutividade do cálcio é muito mais rápida que no sistema uniporte. Quando a concentração citoplasmática de cálcio é elevada, a entrada na mitocôndria é mediada quer pelo RaM quer pelo sistema uniporte, embora este último não transporte Ca^{2+} quando concentração deste íon se encontra abaixo do limiar. Recentemente foram descritas outras proteínas que funcionam como transportadores de Ca^{2+} , como por exemplo os recetores de rianodina (mRyR), as proteínas desacopladoras (UCP2 e UCP3) e os canais de cálcio mitocondrial altamente seletivos (mCa1 e mCa2)

O fluxo de cálcio da mitocôndria ocorre por via de dois transportadores: $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ e $\text{Na}^+ - \text{H}^+$. Estas duas vias apesar de possuírem cinéticas distintas necessitam de energia pois o fluxo de cálcio ocorre contra o gradiente eletroquímico.

A atividade destes transportadores tende a saturar quando as concentrações de Ca^{2+} mitocondriais aumentam, contrariamente ao sistema uniporte que não satura, visto ser um canal. Como consequência direta deste sistema de transporte, quando a concentração de Ca^{2+} mitocondrial aumenta acima de determinado limiar, a mitocôndria necessita adaptar-se a essa sobrecarga, requerendo que a célula despenda mais energia para manter a homeostase.

São conhecidos alguns moduladores da MCU que regulam a entrada de cálcio na mitocôndria, sendo de referir os catiões bivalentes (magnésio e bário) que competem com o Ca^{2+} pelo transporte via uniporte. De salientar a existência de inibidores específicos do uniporte de cálcio como é o caso do vermelho de ruténio [112].

Mitocôndria e produção de ROS

A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) ocorre naturalmente na sequência de várias reações metabólicas ou como resposta a estímulos.

As principais espécies reativas de oxigénio (ROS) são o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que induzem toxicidade devido à interferência com a sinalização das vias de transdução e à interação quer com as estruturas envolventes, quer com as macromoléculas. As espécies reativas de oxigénio (ROS) têm a capacidade de induzir reações de oxidação e modificar lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos e ativar/inativar vias de sinalização celulares [113].

A principal fonte de produção de ROS é a mitocôndria, sendo um processo fisiológico e contínuo, resultando do metabolismo aeróbio. A mitocôndria é o organelo celular mais suscetível de ser lesado como consequência do dano induzido pelo processo oxidativo.

A produção de ROS ocorre preferencialmente nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, ainda que foi recentemente descrito que o Complexo II também pode estar implicado. Em situações de défice de oxigénio ou de utilização de inibidores (ex. cianeto [complexo IV] ou a antimicina A [complexo III]), ocorre um aumento da produção de ROS [114].

As células desenvolveram mecanismos de defesa onde se incluem processos de reparação e remoção de moléculas danificadas e sistemas de proteção antioxidantes não enzimáticos (ex. glutathiona reduzido GSH) e antioxidantes enzimáticos (ex. superóxido dismutase) [115]. Quando a produção de ROS ultrapassa os mecanismos de defesa, ocorre um desequilíbrio com a consequente ocorrência de dano mitocondrial e subsequente disfunção celular, que pode levar à perda irreversível da função mitocondrial e conduzir à morte celular.

Mitocôndria e processos de apoptose/necrose celular

A mitocôndria desempenha um papel chave no processo de morte celular. Na generalidade assume-se que a morte celular por necrose está relacionada com o défice de ATP, contrariamente ao que ocorre na apoptose onde o ATP disponível é suficiente.

A necrose celular resulta de alterações que modificam a atividade metabólica condicionando depleção de ATP. Esta diminuição da disponibilidade de ATP desencadeia alterações ao nível do citoesqueleto da célula, condicionando intumescência celular, que é um sinal eminente de necrose celular. Na primeira fase de necrose celular, ocorre despolarização mitocondrial, desregulação iónica e subsequente perda de integridade da membrana plasmática. Como consequência da permeabilização da membrana plasmática e da lise celular, os componentes intracelulares são libertados, desenvolvendo-se um processo inflamatório, que lesa a população celular adjacente [116, 117].

A apoptose ou morte celular programada, é frequentemente iniciada por estímulos específicos. Neste processo as células morrem de forma individualizada, adquirindo alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose como sejam a diminuição do volume celular, condensação da cromatina e a fragmentação nuclear [118]. A apoptose envolve compostos específicos como por exemplo: caspases (proteases), ativadores de caspases, proteínas da família Bcl-2 e os inibidores das proteínas de apoptose (IAP) [119, 120].

A apoptose resulta de uma variedade de estímulos que podem ter origem extracelular ou intracelular, que condicionam a libertação de citocromo c a partir da mitocôndria o que leva à ativação de caspases. Subsequentemente no interior da célula ocorre degradação proteolítica, levando à formação de corpos apoptóticos que são uma

característica da apoptose. Estes fragmentos celulares são posteriormente degradados e reciclados por fagocitose.

A necroptose é um tipo de morte celular que se assemelha em morfologia à necrose clássica. Este processo deve-se a uma alteração súbita da permeabilidade da membrana, que conduz a uma depleção de ATP, ao conseqüente bloqueio da ativação de caspases e à rotura da membrana plasmática, desencadeando um desvio da morte celular de apoptose para necrose. Este processo foi implicado em diversas condições patofisiológicas, nomeadamente nas lesões induzidas pela isquemia/reperfusão (I/R) [121, 122].

Isquemia/reperfusão (I/R)

As lesões resultantes do processo de isquemia/reperfusão (I/R) induzem dano celular como consequência do retorno de oxigénio após um período de hipoxia. Estas lesões podem ser observadas em diversas situações clínicas, sendo de destacar a transplantação, as lesões térmicas e algumas intervenções cirúrgicas hepáticas.

No processo de isquemia/reperfusão, existe uma especificidade exclusiva da transplantação, pois nesta, ocorre um período de isquemia fria utilizado de forma a diminuir a atividade metabólica do enxerto. Posteriormente a este período de isquemia fria segue-se um período de isquemia quente e posterior reperfusão arterial (Figura 12).

Este período específico de isquemia fria, tem início na colheita, quando o órgão é perfundido por uma solução de perfusão em condições de hipotermia (usualmente a 4 °C) e termina com o início do implante do órgão, quando este atinge a temperatura fisiológica. À isquemia fria segue-se um período de isquemia quente que termina com a realização das anastomoses vasculares após a qual é restabelecido o fluxo sanguíneo [123].

Este processo de isquemia/reperfusão (I/R) é responsável pela maior parte das lesões celulares no transplante hepático, estando também relacionado com a falência do enxerto, pelo que se considera que este fenómeno interfere com a morbidade e mortalidade dos doentes [124].

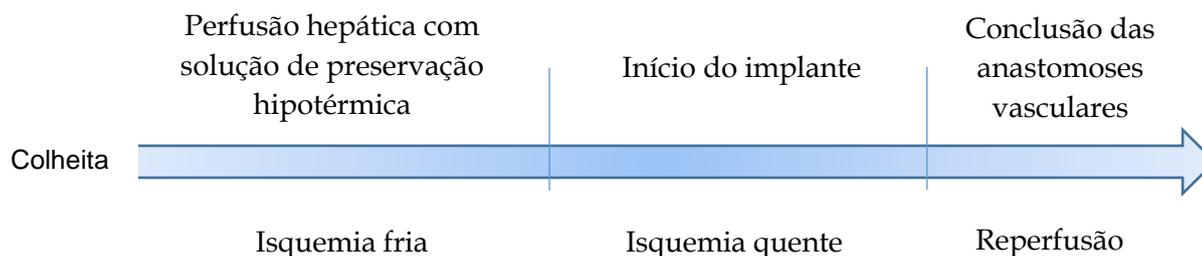


FIGURA 12- CRONOGRAMA DAS DIFERENTES FASES DE I/R DURANTE A TRANSPLANTAÇÃO HEPÁTICA

Os mecanismos celulares e moleculares induzidos pela isquemia/reperfusão (I/R) são pouco conhecidos, embora se reconheça que os hepatócitos e as células epiteliais biliares sejam afetados. A isquemia fria e a isquemia quente podem produzir lesões comuns e específicas, sabendo-se que as células sinusoidais endoteliais são as mais suscetíveis ao efeito da preservação fria, enquanto que os hepatócitos são preferencialmente afetados na fase de reperfusão.

As lesões induzidas pela reperfusão arterial podem ter duas fases distintas: lesões precoces que compreende as primeiras 2h após a reperfusão e lesões tardias, que se podem prolongar até 48h após a reperfusão.

A fase precoce é caracterizada pela ativação de células do sistema imunitário e pela indução de *stress* oxidativo. Nesta fase, assiste-se à ativação das células de Kupffer que levam à produção de ROS e desencadeiam dano hepatocelular. Estas lesões induzidas pelo processo oxidativo aumentam como consequência da produção e libertação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α - factor de necrose tumoral, interleucinas IL-12 e IL-1b), contribuindo desta forma para a amplificação do processo inflamatório [125].

A fase tardia é mediada por neutrófilos, cujo envolvimento depende de quimiocinas libertadas durante a fase precoce. Estes produzem proteases e outras enzimas citotóxicas (ex. colagenases, elastase), que atuam promovendo a degradação celular [126, 127].

Alterações mitocondriais associadas à isquemia/reperfusão

A atividade mitocondrial é afetada pelo processo de isquemia/reperfusão (I/R), pois pode induzir alterações críticas para o seu funcionamento. A principal alteração está relacionada com eventuais alterações ao nível do metabolismo energético.

Na isquemia fria, o déficit de oxigénio e a redução da atividade metabólica levam à diminuição da síntese de ATP, por redução da normal atividade da cadeia respiratória mitocondrial. Como consequência, as enzimas dependentes de ATP vão ser afetadas desencadeando um aumento concomitante das concentrações de ADP, AMP e Pi, que se acompanham de perturbações na translocação de iões ao nível da membrana e de alterações da estrutura do citoesqueleto. Nesta fase, o ATP consumido é utilizado para preservar o potencial de membrana mitocondrial visto que a quantidade de ATP produzida pela via glicolítica é insuficiente [128].

Durante a isquemia, verifica-se um aumento da concentração intracelular dos iões de H^+ , Na^+ e Ca^{2+} que condicionam o agravamento da disfunção mitocondrial. O aumento da concentração intracelular de Na^+ leva à inibição da bomba de Na^+/K^+ ATPase por depleção de ATP, e promove um influxo de Ca^{2+} através do transportador de membrana Na^+-Ca^{2+} , responsável pela ocorrência de lesões celulares irreversíveis.

O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , associado à insuficiência do transportador de membrana Ca^{2+} -ATPase, afeta sobretudo as células sinusoidais endoteliais [129].

As espécies reativas de oxigénio (ROS) promovem a peroxidação dos componentes dos fosfolípidos da membrana mitocondrial interna, levando a uma perturbação do fluxo de eletrões ao longo da cadeia transportadora de eletrões.

Durante a fase de reperfusão, o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), é responsável pelo dano mitocondrial, sobretudo por afetar lípidos e proteínas mitocondriais. Se a lesão induzida no tecido for de curta duração, a mitocôndria tem mecanismos de autorreparação que mantém a capacidade de produzir ATP, mas se essa agressão for contínua e se prolongar no tempo os mecanismos que permitem preservação da homeostase mitocondrial são ultrapassados, tornando o dano mitocondrial irreversível [130].

As lesões na mitocôndria iniciam-se com a alteração da permeabilidade de transição mitocondrial (MPT), condicionando um colapso da membrana mitocondrial interna como

consequência do aumento de permeabilidade da membrana, permitindo a passagem de solutos de massa molecular até 1500 Da. Este facto, leva à passagem de certos fatores apoptóticos do espaço intermembranoso para o citoplasma, de realçar o citocromo c, através de canais formados por Bax, que são membros da família pró-apoptótica Bcl-2.

Após a isquemia/reperfusão o padrão predominante de morte celular é a necrose, embora o envolvimento de eventos de alteração da permeabilidade de membrana (MPT) possa iniciar processos de apoptose no fígado isquémico [131, 132].

A eliminação de mitocôndrias danificadas ocorre por um processo seletivo de autofagia, denominada por mitofagia, uma via catabólica que favorece a sobrevivência celular por preservação dos níveis energéticos e prevenção da acumulação de mitocôndrias danificadas assim como de subprodutos citotóxicos mitocondriais. A autofagia mitocondrial pode ser mediada por fatores dependentes e independentes da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) [133, 134].

Em condições de normoxia ou em curtos períodos de isquemia, o estímulo indutor de mitofagia é negligenciável porque poucas mitocôndrias são danificadas. Por contraste, em condições de isquemia/reperfusão prolongadas, o aumento da concentração de Ca^{2+} e dos níveis de ROS conduzem à lesão de grande número de mitocôndrias, desencadeando um estímulo promotor da mitofagia, que deverá ser breve, de modo a prevenir a falência generalizada da autofagia como consequência do elevado número de mitocôndrias danificadas [135].

Objetivos da tese

Na cirurgia hepática e particularmente na transplantação hepática, a disfunção mitocondrial está implicada nas lesões induzidas pela isquemia/reperfusão. A identificação precoce destas alterações celulares e moleculares pode contribuir para um redução da falência dos fígados transplantados e promover uma melhoria dos resultados obtidos. A adoção de novas estratégias protetoras visa reduzir o impacto das lesões induzidas pela isquemia/reperfusão sobre a função mitocondrial e metabolismo bioenergético, permitindo a optimização e eventual incremento dos fígados disponíveis para transplante.

O objetivo desta tese consiste em determinar alterações, nos tecidos hepáticos vivos, envolvendo a atividade mitocondrial hepática com o intuito de identificar, nos enxertos hepáticos, novos fatores prognósticos envolvidos no processo de isquemia/reperfusão.

Para tal, realizou-se um estudo de investigação translacional, utilizando biópsias de fígados humanos de transplantes hepáticos e biópsias de fígados de ratos Wistar. Pretendeu-se responder às seguintes questões: 1) avaliar a função mitocondrial e o metabolismo energético associado aos diferentes padrões de lesão hepática induzidos pela isquemia/reperfusão nos fígados humanos e nos fígados do modelo animal; 2) comparar os efeitos da isquemia/reperfusão no status metabólico hepático e na função mitocondrial; 3) avaliar os efeitos da duração do tempo de isquemia na regulação da função mitocondrial e no metabolismo energético; 4) identificar possíveis estratégias protetoras das lesões hepáticas induzidas pela isquemia/reperfusão, tendo em vista a preservação da função mitocondrial e do balanço bioenergético hepático.

Parte II

MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO I

Estudo clínico dos efeitos da I/R na função mitocondrial e metabolismo energético hepático em biópsias humanas de transplante hepático

No estudo clínico foram incluídos doentes submetidos a transplante hepático, no período compreendido entre março de 2015 até outubro de 2016. O estudo mereceu aprovação da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os doentes foram informados do presente estudo, tendo-se obtido o consentimento informado de cada doente.

Este estudo considerou os tempos de: isquemia fria, como o período compreendido entre o início da colheita, onde o órgão é perfundido por uma solução de perfusão hipotérmica (4 °C) e o início do implante do órgão; isquemia quente como o período que se inicia imediatamente após o período de isquemia fria e que termina com a realização das anastomoses vasculares; o tempo total de cirurgia corresponde ao período de tempo que decorre entre a realização da hepatectomia total do recetor, envolve a anastomose do implante e que termina com o encerramento da parede abdominal.

Os reagentes e produtos químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), exceto quando indicados. De referir que os compostos tinham o maior grau de pureza comercialmente disponível.

Estudo da população e procedimentos cirúrgicos

Este estudo incluiu 28 doentes transplantados, dos quais 22 do sexo masculino e 6 do sexo feminino. A idade média foi de 56 anos com variação entre 1 e os 73 anos.

As principais indicações para a realização de transplante hepático foram: carcinoma hepatocelular em fígado cirrótico (11, ou 39,3 %), doença colestática (6, ou 21,4 %), cirrose alcoólica (4, ou 14,3 %), polineuropatia amiloidótica familiar (4, ou 14,3 %), intoxicação (*Amanita phalloides* e paracetamol) (2, ou 7,1 %) e metástase de carcinoma colo-rectal (1, ou 3,6%).

A duração média dos transplantes hepáticos foi de 9h10min e os tempos médios de isquemia fria e isquemia quente foram 5h31min e 1h54min respetivamente.

Os dados clínicos e operatórios estão detalhados na Tabela 6.

Recetores	N = 28	100 %
Masculino / Feminino	22/6	
Idade (média / variação)	56 anos [1-73]	
IMC adultos (média ± desvio padrão, variação)	25,9 ± 3,4 Kg.m ² [21,4 – 35,1]	
Indicações		
Carcinoma hepatocelular em fígado cirrótico	11	39,3 %
Doença colestática	6	21,4 %
Cirrose alcoólica	4	14,3 %
PAF	4	14,3 %
Intoxicação	2	7,1 %
Metástase de carcinoma colo-rectal	1	3,6 %
MELD (mediana / variação)	18 [10-38]	
Peso do fígado nativo (média / variação)	1193 gr [636 – 2991 gr]	
Tempo total da cirurgia (média ± desvio padrão, variação)	9h10min ± 1h38min [6h - 13h10 min]	
Tempo de isquemia fria (média ± desvio padrão, variação)	5h31min ± 1h10min [2h - 8h13min]	
Tempo de isquemia quente (média ± desvio padrão, variação)	1h54min ± 24min [1h18min - 3h10min]	
Tempo de internamento (médio, variação)	28 dias [8 – 127 dias]	
Transfusões intraoperatórias		
Sim	18	64 %
Não	10	36 %
Morbilidade (≤30 dias)		
Sim	6	21 %
Não	22	79 %
Morbilidade (>30 dias)		
Sim	2	7 %
Não	26	93 %
Mortalidade		
Sim	2	7 %
Não	26	93 %

TABELA 6- DADOS CLÍNICOS DOS DOENTES TRANSPLANTADOS

Dados clínicos dos doentes submetidos a transplante hepático. MELD (Modelo para doença hepática terminal); IMC (Índice de massa corporal); PAF (Polineuropatia amiloidótica familiar).

Relativamente aos dadores, 11 eram do sexo masculino e 17 do sexo feminino, com idades médias de 54 anos (variação de 22 - 82).

A principal causa de morte foi o acidente vascular cerebral (79 %) sendo de destacar o tipo hemorrágico, que representou 90 % destas causas de morte. Seguiram-se os traumatismos cranioencefálicos (TCE) (14 %) e as restantes estiveram relacionadas com outras causas de morte (7 %).

Dos dadores, 89 % estiveram internados numa unidade de cuidados intensivos por um período médio de 3 dias, tendo a grande maioria (96 %) necessitado de ventilação mecânica.

De realçar que 61 % dos dadores tinham antecedentes pessoais patológicos, sendo que destacar a hipertensão arterial (82 %), diabetes (18 %) e a dislipidemia (12 %).

Os dados clínicos dos dadores estão detalhados na Tabela 7.

Dadores	N = 28	100 %
Masculino / Feminino	11/17	
Idade (média / variação)	54 anos [22 - 82]	
IMC (média \pm desvio padrão, variação)	24,5 \pm 2,9 Kg.m ² [17 -29]	
Grupo sanguíneo		
Grupo A+	13	46 %
Grupo A-	3	11 %
Grupo O+	9	32 %
Grupo O-	3	11 %
Causa de morte		
AVC	22	79 %
TCE	4	14 %
Outras	2	7 %
Patologias associadas		
Sim	17	61 %
Não	11	39 %
HTA		
Sim	14	50 %
Não	14	50 %
Diabetes		
Sim	3	10,7 %
Não	25	89,3 %

Dislipidemia			
	Sim	2	7,1 %
	Não	26	92,9 %
Internamento em UCI			
	Sim	25	89 %
	Não	3	11 %
Nº de dias de internamento na UCI (média / variação)		3 dias [1-9 dias]	
Ventilação mecânica			
	Sim	27	96 %
	Não	1	4 %
Necessidade de aminos			
	Sim	19	68 %
	Não	9	32 %
Peso do fígado (média / variação)		1503 gr [1032 – 1925 gr]	
Graus de esteatose			
	0 (< 5 %)	27	96,4 %
	1 (5-33 %)	1	3,6 %
Inflamação lobular			
	Ligeira	22	78,6 %
	Moderada	6	21,4 %

TABELA 7- DADOS CLÍNICOS DOS DADORES HEPÁTICOS

Dados clínicos dos dadores hepáticos. IMC (índice de massa corporal); HTA (hipertensão arterial); AVC (acidente vascular cerebral); TCE (traumatismo cranioencefálico); UCI (Unidade de cuidados intensivos).

Procedimento cirúrgico

O tempo necessário para efetuar a hepatectomia total do fígado nativo foi variável, dependendo da patologia de base dos doentes e de eventuais alterações anatómicas.

A retirada do fígado da solução de preservação a 4 °C só acontece quando o campo cirúrgico se encontra preparado para receber o órgão, permitindo que as anastomoses vasculares sejam imediatamente realizadas.

Nos doentes adultos, a técnica utilizada para a realização do transplante hepático foi a técnica de piggyback, que compreende a anastomose da veia cava supra-hepática do dador à confluência das veias hepáticas do recetor e posterior encerramento do shunt

porto-cava, a realização das anastomose da veia porta, da artéria hepática e finalmente da via biliar principal.

Nas crianças, foi realizado o transplante de fígado reduzido tendo-se utilizado os segmentos II, III e IV.

Recolha das biópsias

Foram realizadas duas biópsias hepáticas com dimensão de 1 cm por 1 cm, tendo a primeira sido realizada antes da retirada do fígado da solução de preservação mantida no gelo e a segunda biópsia foi obtida 60 minutos após o término da reperfusão arterial. De referir que as biópsias foram colhidas no mesmo segmento hepático.

Após a colheita, as biópsias foram enviadas de imediato para o laboratório. Parte da amostra foi prontamente processada tendo sido colocado o tecido vivo num meio de Sacarose 250 mM, EGTA 0.5 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4) e o restante tecido foi congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C.

Isolamento de mitocôndrias de fígado humano

As mitocôndrias foram isoladas de acordo com o descrito em Rolo et al., 2000. O meio de homogeneização continha Sacarose 250 mM, EGTA 0,5 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4) e 0,1 % de albumina de soro bovino deslipidado (BSA). A composição do meio de lavagem é em tudo semelhante ao da homogeneização, excetuando a ausência de EGTA e de BSA, ajustado a pH 7,4.

A amostra de fígado foi rapidamente extraída e colocada em meio de homogeneização frio (2 - 4 °C). Todos os passos foram realizados mantendo o equipamento laboratorial com o fígado sobre gelo granulado de modo a assegurar a manutenção de uma temperatura baixa.

O fígado foi cortado em pequenos fragmentos e lavado com meio de homogeneização de modo a remover o excesso de sangue. Seguidamente, foi colocado em cerca de 10 volumes do meio, num homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem* com um pistão de teflon, tendo sido homogeneizado com o pistão rodando a 250 rpm até se obter uma suspensão homogénea.

O homogeneizado foi centrifugado a 2 500 xg durante 10 min, num rotor SS-34 e numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-6 à temperatura de 4 °C. Esta primeira centrifugação tem como intuito remover os componentes mais densos das células (núcleos, eritrócitos, células não fragmentadas). O sobrenadante foi decantado para novos tubos de centrífuga, tendo o cuidado de não haver contaminação com partículas sedimentadas e diluído com meio de homogeneização. Este sobrenadante foi centrifugado a 10 000 xg durante 10 min, a 4 °C, para se obter a fração mitocondrial. Esta fração sedimentada foi ressuspensa num pequeno volume de meio de lavagem, e posteriormente diluída em cerca de 40 mL de meio de lavagem, colocada em novos tubos de centrífuga e novamente centrifugada a 10 000 xg durante 10 min. Esta operação foi repetida e a fração mitocondrial purificada obtida foi ressuspensa em meio de lavagem, colocada em *eppendorfs* de 1,5 mL que foram mantidos em gelo granulado durante a duração dos ensaios com material fresco. Todos os ensaios utilizando material fresco decorreram durante as primeiras 6 h após o isolamento.

Lavagem e purificação

A concentração proteica foi determinada pelo método colorimétrico do Biureto. A amostra de suspensão mitocondrial (50 µL) foi solubilizada pela adição de 50 µL de deoxicolato a 10 %. Adicionou-se água desionizada até perfazer 0,5 mL, adicionando-se em seguida 2 mL de reagente de biureto. Prepararam-se padrões de BSA (0, 0,25 e 0,50 mL) em que a água desionizada foi adicionada de modo que, conjuntamente com a BSA, o volume perfizesse 0,5 mL (ou seja, respetivamente, 0,50, 0,25 e 0 mL). A estes padrões foram adicionados 50 µL de meio de lavagem, 50 µL de SDS/DOC e, finalmente, 2 mL de reagente de biureto. Os tubos foram sujeitos a agitação por meio de um vortex e repousaram durante 10 min. Após este período, a absorvência das amostras e padrões foi medida a 540 nm, num espectrofotómetro Thermo, série Helios.

Avaliação do potencial transmembranar nas mitocôndrias

O potencial transmembranar ($\Delta\psi$) foi avaliado com base na distribuição transmembranar do ião tetrafenilfosfónio (TPP⁺) como descrito por Palmeira et al. 1994. Utilizou-se um elétrodo seletivo para TPP⁺, preparado no nosso laboratório e um elétrodo de referência de calomelano. A entrada do TPP⁺ nas mitocôndrias foi determinada pelo decréscimo

da concentração de TPP⁺ no meio, por registo do potencial do eléctrodo. A diferença de potencial gerada entre o eléctrodo seletivo e o de referência foi medida com um electrómetro e o sinal foi debitado para um registador, depois de passar por um circuito de compensação de voltagem basal.

Utilizaram-se apenas os eléctrodos que apresentaram uma correlação linear com o logaritmo da concentração de TPP⁺, com uma inclinação de 59 ± 1 , isto é, com uma boa aproximação à inclinação prevista pela equação de Nernst.

As reacções decorreram a 25 °C, numa câmara de reacção aberta, termoestável, sob agitação magnética contínua. As mitocôndrias (1 mg) foram suspensas em 1 mL de meio normal de respiração (130 mM de Sacarose, 5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 5 mM de KH₂PO₄, 50 µM de EDTA e 5 mM de HEPES a pH 7,4, suplementado com 2 µM de Rotenona e 3 µM de TPP⁺). As mitocôndrias foram energizadas adicionando succinato (5 mM).

A concentração de TPP⁺ utilizada permitiu uma alta sensibilidade nas medições sem induzir efeitos tóxicos nas mitocôndrias

O $\Delta\psi$ foi calculado de acordo com a equação (a 25 °C):

$$\Delta\psi \text{ (mV)} = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1)$$

de acordo com Kamo et al. [136]. v , V e ΔE representam o volume mitocondrial, volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eléctrodo desde a linha basal, respetivamente. Assumiu-se um volume matricial das mitocôndrias de 1,1 µL/mg de proteína. Não foram efetuadas correções devidas à contribuição da ligação passiva de TPP⁺ à membrana mitocondrial visto que, nas experiências realizadas, estávamos interessados na determinação das alterações relativas dos potenciais e não nos seus valores absolutos. Como consequência, é de prever que os valores de $\Delta\psi$ apresentados estejam avaliados por excesso. No entanto, este problema surge para valores próximos de 90 mV, longe dos valores aqui apresentados. O valor da Lag phase foi calculado pela simples medição do tempo decorrido desde o início do ciclo fosforilativo (coincidente com a adição do ADP) até ao seu fim (restabelecimento de um potencial de repouso).

Determinação da atividade respiratória das mitocôndrias

Os ensaios foram realizados a 25 °C numa câmara de reação fechada, termostaticada e com capacidade de 1,3 mL. O consumo de O₂ foi determinado polarograficamente com um eletrodo do tipo Clark, ligado a um registador através de uma caixa de voltagem fabricada no laboratório, como previamente descrito por Rolo et al. [137]. No decorrer das experiências, a suspensão mitocondrial foi sujeita a uma agitação magnética contínua, por meio de um pequeno magneto inserido na câmara.

As reações foram iniciadas por adição da suspensão mitocondrial (1 mg) ao meio normal de respiração como anteriormente descrito. As mitocôndrias foram energizadas com a adição de 5 mM de Succinato que causou um pequeno consumo de O₂, devendo-se este a resquícios de ADP ainda presentes na suspensão, bem como a uma perda de potencial de membrana normal numa membrana virtualmente impermeável a prótons, mas não totalmente impermeável. A adição de 200 nmol de ADP estimulou a respiração e desencadeou o estado respiratório 3. Após todo o ADP adicionado ter sido fosforilado a ATP, a respiração reassume uma velocidade lenta, o denominado estado respiratório 4.

A determinação da respiração mitocondrial dissociada da fosforilação oxidativa foi efetuada recorrendo-se à adição de 1 µM de FCCP, um protonóforo que dissocia energeticamente as mitocôndrias, por destruição do gradiente prótonico transmembranar. De modo a que somente os efeitos do FCCP fossem registados, e não um possível consumo de ADP resquicial, ocorreu a adição prévia de 3 µM de Oligomicina, que é um inibidor específico da ATPsintase.

Os valores da respiração foram calculados pelo traçado de uma tangente ao registo no local do estado desejado, fosse ele o Estado 3, 4 ou vFCCP. Com uma simples triangulação, o consumo foi determinado. Para os índices, o ICR (Índice de Controlo Respiratório) foi determinado simplesmente pelo quociente entre o valor do Estado 3 pelo do Estado 4; já o índice ADP/O foi calculado pelo quociente entre o ADP fosforilado e o oxigénio consumido durante o período fosforilativo, ou seja, durante o estado respiratório 3.

Quantificação de ATP

A amostra foi congelada em azoto líquido e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia da extração, a amostra foi pulverizada com almofariz e pistão em azoto líquido e homogeneizada em $25\text{ }\mu\text{L}$ de tampão KOH (KOH 2,5 M, K_2HPO_4 1,5 M). Esta mistura foi centrifugada a $14\ 000\text{ }xg$ durante 2 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes daí resultantes foram recolhidos e dissolvidos em $100\text{ }\mu\text{L}$ de K_2HPO_4 1 M. O pH foi ajustado para 7 com HCl e os nucleótidos de adenina foram quantificados com um kit (Sigma-Aldrich) de bioluminescência de ATP num leitor de placas Victor 3.

Avaliação da função hepática pós-operatória e evolução clínica

O doseamento do lactato arterial foi realizado no final da intervenção cirúrgica e repetido a cada 6 h durante as primeiras 24 h. Foram efectuadas determinações bioquímicas convencionais de marcadores da função hepática e de necrose hepatocelular: TGO, TGP, bilirrubina total, bilirrubina direta, International Normalized Ratio (INR) nos 1^o, 3^o, 5^o e 7^o dias de pós-operatório [138-140].

O cálculo da *clearance* de lactato arterial foi baseada no trabalho publicado por Nguyen et al. [141].

A morbidade pós-operatória foi definida e classificada de acordo com a classificação de Dindo-Clavien. A morbidade específica hepática precoce (≤ 30 dias) e tardia (> 30 dias) foi caracterizada de acordo com um evento diretamente relacionado com o transplante hepático. A mortalidade operatória foi definida num período de 30 dias após a realização do transplante hepático [142, 143].

Análise estatística

Todas as variáveis contínuas foram apresentadas com média \pm desvio padrão, salvo condição específica. A distribuição de normalidade das variáveis contínuas foi realizada com base no teste de Shapiro-Wilk. As variáveis qualitativas foram comparadas com o teste de qui-quadrado (χ^2). As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram comparadas com o teste *t* de Student e os que não seguem uma distribuição normal foram analisados com o teste de Mann-Whitney. As correlações foram realizadas com os testes de Pearson ou de Spearman de acordo com a distribuição das amostras.

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS™ (IBM Corp., Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Considerado os resultados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

CAPÍTULO II

Estudo experimental do efeito da I/R e da reperfusão hipotérmica na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático

Materiais

Os reagentes e produtos químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), exceto quando indicados. De referir que os compostos tinham o maior grau de pureza comercialmente disponível.

Animais e tratamentos

Os animais de laboratório utilizados neste projeto foram ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com 12 semanas de idade, com pesos entre 320 e 350 g e foram adquiridos à Charles River (Charles River, França). Foram mantidos em condições de temperatura, luminosidade e humidade controladas, com acesso *ad libitum* a alimento e água acidada. O estudo foi realizado de acordo com os princípios e procedimentos descritos como “3Rs” nas diretrizes da EU (1986/609/EEC e 2010/63/EU), FELASA e o National Centre for 3Rs, também aprovados pelo Comité de Ética Animal do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra. Aplicados os princípios das diretrizes ARRIVE para a análise e interpretação de dados e todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

Métodos

Foram realizados estudos experimentais no sentido de avaliar eventuais variações da função mitocondrial e da atividade bioenergética, de acordo com: as variações dos tempos de isquemia fria (I) e com a reperfusão hipotérmica (II).

Neste estudo foram utilizados 10 animais por cada grupo analisado, tendo-se considerado hipotermia como uma temperatura inferior a 35 °C e normotermia entre os 35 e os 37 °C.

A metodologia utilizada para analisar a função mitocondrial e a atividade bioenergética mitocondrial foi idêntica para os diferentes ensaios.

Procedimento cirúrgico (I)

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e clorpromazina (50 mg/kg). Depois de uma laparotomia mediana, a veia porta foi canulada e o órgão imediatamente perfundido com solução Celsior a 4 °C durante 10 minutos. Procedeu-se depois à hepatectomia total, mantendo-o em isquemia a 4 °C tendo-se realizado variações dos tempos de isquemia fria (3 h, 6 h, 12 h e 18 h) mantendo os tempos de reperfusão constantes (Figura 13).

Após este período, o fígado foi reperfundido a 37 °C durante 1 h com oxigenação constante, com uma solução Krebs mais soro glicosado (50/50), a pH 7,2. Nestes ensaios foi utilizado um grupo controlo, onde os animais foram submetidos a uma laparotomia e hepatectomia total, realizando-se uma biópsia hepática após este procedimento.

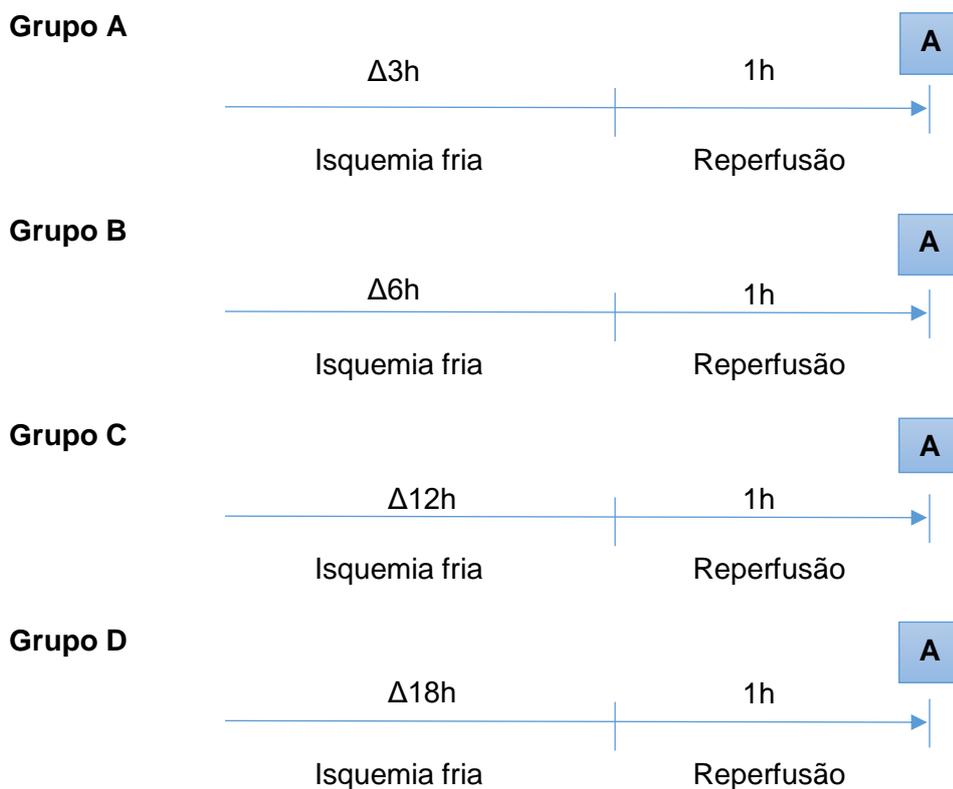


FIGURA 13- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VARIAÇÕES DOS TEMPOS DE ISQUEMIA FRIA MANTENDO CONSTANTES OS TEMPOS DE REPERFUSÃO.

Variações dos tempos de isquemia fria $\Delta 3$ h, $\Delta 6$ h, $\Delta 12$ h e $\Delta 18$ h; A - biópsia no final da reperfusão; Grupo controlo não representado. Utilizados grupos de 10 animais.

Recolha das biópsias (I)

Foram realizados ensaios para as variações dos tempos de isquemia fria (Grupos A, B, C e D). Nestes grupos, os animais foram submetidos a uma laparotomia e hepatectomia total, e as biópsias colhidas de acordo com as condições de tempo anteriormente exemplificadas. De referir que os ensaios clínicos foram realizados em simultâneo.

Procedimento cirúrgico (II)

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e clorpromazina (50 mg/kg). Depois de uma laparotomia mediana, a veia porta foi canulada e o órgão imediatamente perfundido com solução Celsior a 4 °C durante 10 minutos. Procedeu-se depois à hepatectomia total, mantendo-o em isquemia a 4 °C durante 12 h. Após este período, o fígado foi reperfundido a 32 °C ou a 37 °C durante 1 h com oxigenação constante, com uma solução Krebs mais soro glicosado (50/50), a pH 7,2 (Figura 14).

Grupo A



Grupo B

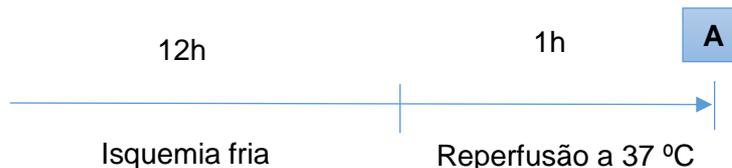


FIGURA 14- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REPERFUSÃO SOB CONDIÇÕES DE HIPOTERMIA E NORMOTERMIA

A - Biópsia no final da reperusão; Grupo controlo não representado. Foram analisados 10 animais por grupo.

Recolha das biópsias (II)

Nos animais do grupo A (reperfusão a 32 °C) e do grupo B (reperfusão a 37 °C) foram submetidos a uma laparotomia e hepatectomia total. Nos grupos A e B, foram colhidas biópsias no final da reperfusão. Nestes ensaios foi utilizado um grupo controlo, onde os animais foram submetidos a uma laparotomia e hepatectomia total, realizando-se uma biópsia hepática após este procedimento. De referir que os ensaios clínicos foram realizados em simultâneo.

Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias foram isoladas de acordo com o descrito em Rolo et al, 2000. O meio de homogeneização continha Sacarose 250 mM, EGTA 0,5 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4) e 0,1 % de albumina de soro bovino deslipidado (BSA). A composição do meio de lavagem é em tudo semelhante ao da homogeneização, excetuando a ausência de EGTA e de BSA, ajustado a pH 7,4.

O fígado foi rapidamente extraído e colocado em meio de homogeneização frio (2 – 4 °C). Todos os passos foram realizados mantendo o equipamento laboratorial com o fígado sobre gelo granulado de modo a assegurar a manutenção de uma temperatura baixa.

O fígado foi cortado em pequenos fragmentos e lavado com meio de homogeneização de modo a remover o excesso de sangue. Seguidamente, foi colocado em cerca de 10 volumes do meio, num homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem* com um pistão de teflon, tendo sido homogeneizado com o pistão rodando a 250 rpm até se obter uma suspensão homogénea.

O homogeneizado foi centrifugado a 2500 xg durante 10 min, num rotor SS-34 e numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-6 à temperatura de 4 °C. Esta primeira centrifugação tem como intuito remover os componentes mais densos das células (núcleos, eritrócitos, células não fragmentadas). O sobrenadante foi decantado para novos tubos de centrífuga, tendo o cuidado de não haver contaminação com partículas sedimentadas e diluído com meio de homogeneização. Este sobrenadante foi centrifugado a 10 000 xg durante 10 min, a 4 °C, para se obter a fração mitocondrial. Esta fração sedimentada foi ressuspensa num pequeno volume de meio de lavagem, e posteriormente diluídas em cerca de 40 mL de meio de lavagem, colocadas em novos tubos de centrífuga e

novamente centrifugadas a 10 000 xg durante 10 min. Esta operação foi repetida e a fração mitocondrial purificada obtida foi ressuspensa em meio de lavagem, colocada em *eppendorfs* de 1,5 mL que foram mantidos em gelo granulado durante a duração dos ensaios com material fresco. Todos os ensaios utilizando material fresco decorreram durante as primeiras 6 h após o isolamento.

Lavagem e Purificação

A concentração proteica foi determinada pelo método colorimétrico do Biureto. A amostra de suspensão mitocondrial (50 μ L) foi solubilizada pela adição de 50 μ L de deoxicolato a 10 %. Adicionou-se água desionizada até perfazer 0,5 mL, adicionando-se em seguida 2 mL de reagente de biureto. Prepararam-se padrões de BSA (0, 0,25 e 0,50 mL) em que a água desionizada foi adicionada de modo que, conjuntamente com a BSA, o volume perfizesse 0,5 mL (ou seja, respetivamente, 0,50, 0,25 e 0 mL). A estes padrões foram adicionados 50 μ L de meio de lavagem, 50 μ L de SDS/DOC e, finalmente, 2 mL de reagente de biureto. Os tubos foram sujeitos a agitação por meio de um vortex e repousaram durante 10 min. Após este período, a absorvência das amostras e padrões foi medida a 540 nm, num espectrofotómetro Thermo, série Helios.

Avaliação do potencial transmembranar nas mitocôndrias

O potencial transmembranar ($\Delta\psi$) foi avaliado com base na distribuição transmembranar do ião tetrafenilfosfónio (TPP⁺) como descrito por Palmeira et al. [144]. Utilizou-se um eléctrodo seletivo para TPP⁺, preparado no nosso laboratório e um eléctrodo de referência de calomelano. A entrada do TPP⁺ nas mitocôndrias foi determinada pelo decréscimo da concentração de TPP⁺ no meio, por registo do potencial do eléctrodo. A diferença de potencial gerada entre o eléctrodo seletivo e o de referência foi medida com um electrómetro e o sinal foi debitado para um registador, depois de passar por um circuito de compensação de voltagem basal.

Utilizaram-se apenas os eléctrodos que apresentaram uma correlação linear com o logaritmo da concentração de TPP⁺, com uma inclinação de 59 ± 1 , com uma boa aproximação à inclinação prevista pela equação de Nernst.

As reações decorreram a 25 °C, numa câmara de reação aberta, termoestável, sob agitação magnética contínua. As mitocôndrias (1 mg) foram suspensas em 1 mL de meio normal de respiração (130 mM de Sacarose, 5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 5 mM de KH₂PO₄, 50 µM de EDTA e 5 mM de HEPES a pH 7,4, suplementado com 2 µM de Rotenona e 3 µM de TPP⁺). As mitocôndrias foram energizadas adicionando succinato (5 mM).

A concentração de TPP⁺ utilizada permitiu uma alta sensibilidade nas medições sem induzir efeitos tóxicos nas mitocôndrias

O $\Delta\psi$ foi calculado de acordo com Kamo et al. de acordo com a equação anteriormente descrita [136]. v , V e ΔE representam o volume mitocondrial, volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eletrodo desde a linha basal, respetivamente. Assumiu-se um volume matricial das mitocôndrias de 1,1 µL/mg de proteína. Não foram efetuadas correções devidas à contribuição da ligação passiva de TPP⁺ à membrana mitocondrial visto que, nas experiências realizadas, estávamos interessados na determinação das alterações relativas dos potenciais e não nos seus valores absolutos. Como consequência, é de prever que os valores de $\Delta\psi$ apresentados estejam avaliados por excesso. No entanto, este problema surge para valores próximos de 90 mV, longe dos valores aqui apresentados. O valor da Lag phase foi calculado pela simples medição do tempo decorrido desde o início do ciclo fosforilativo (coincidente com a adição do ADP) até ao seu fim (restabelecimento de um potencial de repouso).

Determinação da atividade respiratória das mitocôndrias

Os ensaios foram realizados a 25 °C numa câmara de reação fechada, termostaticada e com capacidade de 1,3 mL. O consumo de O₂ foi determinado polarograficamente com um eletrodo do tipo Clark, ligado a um registador através de uma caixa de voltagem fabricada no laboratório, como previamente descrito por Rolo et al. [137]. No decorrer das experiências, a suspensão mitocondrial foi sujeita a uma agitação magnética contínua, por meio de um pequeno magnete inserido na câmara.

As reações foram iniciadas por adição da suspensão mitocondrial (1mg) ao meio normal de respiração como anteriormente descrito. As mitocôndrias foram energizadas com a adição de 5 mM de Succinato que causou um pequeno consumo de O₂, devendo-se este a resquícios de ADP ainda presentes na suspensão, bem como a uma perda de

potencial de membrana normal numa membrana virtualmente impermeável a prótons, mas não totalmente impermeável. A adição de 200 nmol de ADP estimulou a respiração e desencadeou o estado respiratório 3. Após todo o ADP adicionado ter sido fosforilado a ATP, a respiração reassume uma velocidade lenta, o denominado estado respiratório 4.

A determinação da respiração mitocondrial dissociada da fosforilação oxidativa foi efetuada recorrendo-se à adição de 1 μM de FCCP, um protonóforo que dissocia energeticamente as mitocôndrias, por destruição do gradiente protónico transmembranar. De modo a que somente os efeitos do FCCP fossem registados, e não um possível consumo de ADP residual, ocorreu a adição prévia de 3 μM de Oligomicina, que é um inibidor específico da ATPsintase.

Os valores da respiração foram calculados pelo traçado de uma tangente ao registo no local do estado desejado, fosse ele o Estado 3, 4 ou vFCCP. Com uma simples triangulação, o consumo foi determinado. Para os índices, o ICR (Índice de Controlo Respiratório) foi determinado simplesmente pelo quociente entre o valor do Estado 3 pelo do Estado 4; já o índice ADP/O foi calculado pelo quociente entre o ADP fosforilado e o oxigénio consumido durante o período fosforilativo, ou seja, durante o estado respiratório 3.

Quantificação de ATP

A amostra foi congelada em azoto líquido e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia da extração, a amostra foi pulverizada com almofariz e pistão em azoto líquido e homogeneizada em 25 μL de tampão KOH (KOH 2,5 M, K_2HPO_4 1,5 M). Esta mistura foi centrifugada a 14 000 $\times g$ durante 2 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes daí resultantes foram recolhidos e dissolvidos em 100 μL de K_2HPO_4 1 M. O pH foi ajustado para 7 com HCl e os nucleótidos de adenina foram quantificados com um kit (Sigma-Aldrich) de bioluminescência de ATP num leitor de placas Victor 3.

Avaliação histológica

Microscopia ótica

Foram analisadas amostras de tecido hepático obtidas no final do procedimento. As amostras de tecido foram inspecionadas, seccionadas em fatias com 3 a 5 mm de espessura, fixadas em 4 % de formaldeído, e incluídas em parafina. As amostras foram posteriormente seccionadas em cortes de 4 μ m e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E, Polysciences, Sakura Autostainer – Prisma 81D). A observação foi efetuada por um patologista experiente, de forma duplamente cega, com recurso a microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i) e as imagens foram obtidas utilizando a câmara Nikon- Digital Sight DS-Fi1.

Análise estatística

Todas as variáveis contínuas foram apresentadas com média \pm desvio padrão, salvo condição específica. A distribuição de normalidade das variáveis contínuas foi realizada com base no teste de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram comparadas com o teste *t* de Student e os que não seguem uma distribuição normal foram analisados com o teste de Mann-Whitney. A comparação entre ≥ 3 grupos foi realizada pelo teste de ANOVA post-hoc para comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS™ (IBM Corp., Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Considerado os resultados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Capítulo III

Estudo experimental do efeito da adição de Berberina à solução de preservação na função mitocondrial e metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático

Os reagentes e produtos químicos foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), exceto quando indicados. De referir que os compostos tinham o maior grau de pureza comercialmente disponível.

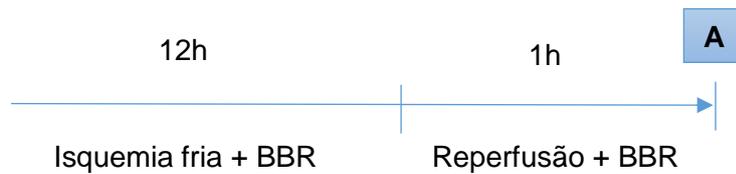
Animais e tratamentos

Os animais de laboratório utilizados neste projeto foram ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com 12 semanas de idade, com pesos entre 320 e 350 g e foram adquiridos à Charles River (Charles River, França). Foram mantidos em condições de temperatura, luminosidade e humidade controladas, com acesso *ad libitum* a alimento e água acidada. O estudo foi realizado de acordo com os princípios e procedimentos descritos como “3Rs” nas diretrizes da EU (1986/609/EEC e 2010/63/EU), FELASA e o National Centre for 3Rs, também aprovados pelo Comité de Ética Animal do Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra. Aplicados os princípios das diretrizes ARRIVE para a análise e interpretação de dados e todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

Procedimento cirúrgico

Neste estudo foram utilizados 10 animais por cada grupo analisado. Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e clorpromazina (50 mg/kg). Depois de uma laparotomia mediana, a veia porta foi canulada e o fígado foi imediatamente perfundido com solução Celsior a 4 °C durante 10 minutos. Procedeu-se depois à hepatectomia total, mantendo-o em isquemia a 4 °C durante 12 h com adição de berberina (18,6 mM) (Grupo A) e sem berberina (Grupo B). Após este período manteve-se a perfusão de berberina nas mesmas concentrações e o fígado foi reperfundido a 37 °C durante 1 h com oxigenação constante, com uma solução Krebs mais soro glicosado (50/50), a pH 7,2 (Figura 15).

Grupo A



Grupo B



FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA O ESTUDO DA ADIÇÃO DE BERBERINA (BBR) À SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO HEPÁTICA

A - Biópsia no final da reperusão; Grupo controlo não representado. Foram analisados 10 animais por grupo.

Recolha das biópsias

Nos animais do grupo A (com adição da berberina) e do grupo B (sem adição de berberina) foram submetidos a uma laparotomia e hepatectomia total. Nos grupos A e B, foram colhidas biópsias no final da reperusão. Nestes ensaios foi utilizado um grupo controlo, onde os animais foram submetidos a uma laparotomia e hepatectomia total, realizando-se uma biópsia hepática após este procedimento. De referir que os ensaios clínicos foram realizados em simultâneo.

Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias foram isoladas de acordo com o descrito em Rolo et al., 2000. O meio de homogeneização continha Sacarose 250 mM, EGTA 0,5 mM e HEPES 10 mM (pH 7,4) e 0,1 % de albumina de soro bovino deslipídado (BSA). A composição do meio de lavagem é em tudo semelhante ao da homogeneização, excetuando a ausência de EGTA e de BSA, ajustado a pH 7,4.

O fígado foi rapidamente extraído e colocado em meio de homogeneização frio (2 – 4 °C). Todos os passos foram realizados mantendo o equipamento laboratorial com o

fígado sobre gelo granulado de modo a assegurar a manutenção de uma temperatura baixa.

O fígado foi cortado em pequenos fragmentos e lavado com meio de homogeneização de modo a remover o excesso de sangue. Seguidamente, foi colocado em cerca de 10 volumes do meio, num homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem* com um pistão de teflon, tendo sido homogeneizado com o pistão rodando a 250 rpm até se obter uma suspensão homogénea.

O homogeneizado foi centrifugado a 2500 xg durante 10 min, num rotor SS-34 e numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-6 à temperatura de 4 °C. Esta primeira centrifugação tem como intuito remover os componentes mais densos das células (núcleos, eritrócitos, células não fragmentadas). O sobrenadante foi decantado para novos tubos de centrífuga, tendo o cuidado de não haver contaminação com partículas sedimentadas e diluído com meio de homogeneização. Este sobrenadante foi centrifugado a 10 000 xg durante 10 min, a 4 °C, para se obter a fração mitocondrial. Esta fração sedimentada foi ressuspensa num pequeno volume de meio de lavagem, e posteriormente diluída em cerca de 40 mL de meio de lavagem, colocada em novos tubos de centrífuga e novamente centrifugada a 10 000 xg durante 10 min. Esta operação foi repetida e a fração mitocondrial purificada obtida foi ressuspensa em meio de lavagem, colocada em *ependorfs* de 1,5 mL que foram mantidos em gelo granulado durante a duração dos ensaios com material fresco. Todos os ensaios utilizando material fresco decorreram durante as primeiras 6 h após o isolamento.

Lavagem e Purificação

A concentração proteica foi determinada pelo método colorimétrico do Biureto. A amostra de suspensão mitocondrial (50 µL) foi solubilizada pela adição de 50 µL de deoxicolato a 10 %. Adicionou-se água desionizada até perfazer 0,5 mL, adicionando-se em seguida 2 mL de reagente de biureto. Prepararam-se padrões de BSA (0, 0,25 e 0,50 mL) em que a água desionizada foi adicionada de modo que, conjuntamente com a BSA, o volume perfizesse 0,5 mL (ou seja, respetivamente, 0,50, 0,25 e 0 mL). A estes padrões foram adicionados 50 µL de meio de lavagem, 50 µL de SDS/DOC e, finalmente, 2 mL de reagente de biureto. Os tubos foram sujeitos a agitação por meio de um vortex e repousaram durante 10 min. Após este período, a absorvência das amostras e padrões foi medida a 540 nm, num espectrofotómetro Thermo, série Helios.

Avaliação do potencial transmembranar mitocôndrial

O potencial transmembranar ($\Delta\psi$) foi avaliado com base na distribuição transmembranar do ião tetrafenilfosfônio (TPP⁺) como descrito por Palmeira et al. 1994. Utilizou-se um eletrodo seletivo para TPP⁺, preparado no nosso laboratório e um eletrodo de referência de calomelano. A entrada do TPP⁺ nas mitocôndrias foi determinada pelo decréscimo da concentração de TPP⁺ no meio, por registo do potencial do eletrodo. A diferença de potencial gerada entre o eletrodo seletivo e o de referência foi medida com um eletrômetro e o sinal foi debitado para um registador, depois de passar por um circuito de compensação de voltagem basal.

Utilizaram-se apenas os eletrodos que apresentaram uma correlação linear com o logaritmo da concentração de TPP⁺, com uma inclinação de 59 ± 1 , com uma boa aproximação à inclinação prevista pela equação de Nernst.

As reações decorreram a 25 °C, numa câmara de reação aberta, termoestável, sob agitação magnética contínua. As mitocôndrias (1 mg) foram suspensas em 1 mL de meio normal de respiração (130 mM de Sacarose, 5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 5 mM de KH₂PO₄, 50 µM de EDTA e 5 mM de HEPES a pH 7,4, suplementado com 2 µM de Rotenona e 3 µM de TPP⁺). As mitocôndrias foram energizadas adicionando succinato (5 mM).

A concentração de TPP⁺ utilizada permitiu uma alta sensibilidade nas medições sem induzir efeitos tóxicos nas mitocôndrias

O $\Delta\psi$ foi calculado de acordo com Kamo et al. de acordo com a equação como anteriormente descrito [136]. v , V e ΔE representam o volume mitocondrial, volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eletrodo desde a linha basal, respetivamente. Assumiu-se um volume matricial das mitocôndrias de 1,1 µL/mg de proteína. Não foram efetuadas correções devidas à contribuição da ligação passiva de TPP⁺ à membrana mitocondrial visto que, nas experiências realizadas, estávamos interessados na determinação das alterações relativas dos potenciais e não nos seus valores absolutos. Como consequência, é de prever que os valores de $\Delta\psi$ apresentados estejam avaliados por excesso. No entanto, este problema surge para valores próximos de 90 mV, longe dos valores aqui apresentados. O valor da Lag phase foi calculado pela

simples medição do tempo decorrido desde o início do ciclo fosforilativo (coincidente com a adição do ADP) até ao seu fim (restabelecimento de um potencial de repouso).

Determinação da atividade respiratória das mitocôndrias

Os ensaios foram realizados a 25 °C numa câmara de reação fechada, termostaticada e com capacidade de 1,3 mL. O consumo de O₂ foi determinado polarograficamente com um elétrodo do tipo Clark, ligado a um registador através de uma caixa de voltagem fabricada no laboratório, como previamente descrito por Rolo et al., 2000 [137]. No decorrer das experiências, a suspensão mitocondrial foi sujeita a uma agitação magnética contínua, por meio de um pequeno ímã inserido na câmara.

As reações foram iniciadas por adição da suspensão mitocondrial (1 mg) ao meio normal de respiração como anteriormente descrito. As mitocôndrias foram energizadas com a adição de 5 mM de Succinato que causou um pequeno consumo de O₂, devendo-se este a resquícios de ADP ainda presentes na suspensão, bem como a uma perda de potencial de membrana normal numa membrana virtualmente impermeável a prótons, mas não totalmente impermeável. A adição de 200 nmol de ADP estimulou a respiração e desencadeou o estado respiratório 3. Após todo o ADP adicionado ter sido fosforilado a ATP, a respiração reassume uma velocidade lenta, o denominado estado respiratório 4.

A determinação da respiração mitocondrial dissociada da fosforilação oxidativa foi efetuada recorrendo-se à adição de 1 µM de FCCP, um protonóforo que dissocia energeticamente as mitocôndrias, por destruição do gradiente prótonico transmembranar. De modo a que somente os efeitos do FCCP fossem registados, e não um possível consumo de ADP resquicial, ocorreu a adição prévia de 3 µM de Oligomicina, que é um inibidor específico da ATPsintase.

Os valores da respiração foram calculados pelo traçado de uma tangente ao registo no local do estado desejado, fosse ele o Estado 3, 4 ou vFCCP. Com uma simples triangulação, o consumo foi determinado. Para os índices, o ICR (Índice de Controlo Respiratório) foi determinado simplesmente pelo quociente entre o valor do Estado 3 pelo do Estado 4; já o índice ADP/O foi calculado pelo quociente entre o ADP fosforilado e o oxigénio consumido durante o período fosforilativo, ou seja, durante o estado respiratório 3.

Quantificação de ATP

A amostra foi congelada em azoto líquido e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia da extração, a amostra foi pulverizada com almofariz e pistão em azoto líquido e homogeneizada em $25\text{ }\mu\text{L}$ de tampão KOH (KOH 2,5 M, K_2HPO_4 1,5 M). Esta mistura foi centrifugada a $14\ 000\text{ }xg$ durante 2 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os sobrenadantes daí resultantes foram recolhidos e dissolvidos em $100\text{ }\mu\text{L}$ de K_2HPO_4 1 M. O pH foi ajustado para 7 com HCl e os nucleótidos de adenina foram quantificados com um kit (Sigma-Aldrich) de bioluminescência de ATP num leitor de placas Victor 3.

Deteção da abertura do mPTP por indução de *swelling*

O *swelling* mitocondrial foi estimado por mudanças na dispersão da luz, monitorizadas espectrofotograficamente a 540 nm de acordo com a descrição de Palmeira e Wallace [145]. A reação que ocorreu a uma temperatura constante de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, iniciou-se após adicionar 1 mg de suspensão mitocondrial a 2 mL a meio de incubação (200 mM de Sacarose, 10 mM de Tris-Mops, 1 mM de KH_2PO_4 , e $10\text{ }\mu\text{M}$ EGTA a pH 7,4), suplementado com $3\text{ }\mu\text{M}$ de Rotenona e 5 mM de Succinato. Após um breve período de reação foram adicionadas diferentes concentrações de CaCl_2 e a um dos ensaios foi também adicionado Ciclosporina A (CyA $1\text{ }\mu\text{M}$), de modo a servir de controlo.

Quantificação de espécies reativas de oxigénio (ROS)

A formação de ROS foi determinada fluorimetricamente com a sonda H_2DCFDA e usando um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 538 nm , num fluorímetro Perkin-Elmer VICTOR. As mitocôndrias isoladas (1 mg/mL) foram suspensas em meio padrão respiratório e carregadas $50\text{ }\mu\text{M}$ H_2DCFDA (preparado em DMSO) durante 15 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, as mitocôndrias foram centrifugadas a $10\ 000\text{ }xg$ durante 3 min e o sobrenadante aspirado e o sedimento mitocondrial foi resuspenso em 1 mL de meio de respiração sem sonda. $200\text{ }\mu\text{L}$ da suspensão mitocondrial foram colocados numa placa de 96 poços e a fluorescência monitorizada durante 30 min para calcular a taxa de formação de ROS. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência arbitrária (RFUs).

Análise de Western blotting

O tecido homogeneizado foi lisado com tampão de lise RIPA gelado suplementado com um cocktail de proteases e inibidores de fosfatase (Sigma-Aldrich; Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL). Quantidades iguais de proteínas (medidas num kit de BCA1-1KT, Sigma – Aldrich), foram carregadas e submetidas a eletroforese num gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF, Laboratório Bio-Rad, Hercules, CA). As membranas foram bloqueadas com 5 % de solução de bloqueio (Bio-Rad) durante 2 h e incubadas em solução salina tamponada com TBS (Tris Buffered Saline) suplementada com 1 % de Tween-20 (TBS-T) e solução de bloqueio a 0,5 % durante a noite a 4 °C, com anti-PGC-1 α (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, 1:100), anti-SirT1 (Cell Signaling Technology, 1:1000), anti-SirT3 (Cell Signaling Technology, 1:500), anti-LC3 (SigmaAldrich, 1:1000) e anti- β -actin (SigmaAldrich, 1:5000). No dia seguinte, as membranas foram lavadas à temperatura ambiente com TBS-T, 3 vezes durante 30 min e incubadas com um anticorpo secundário correspondente (Invitrogen, Carlsbad, CA). As membranas foram então lavadas à temperatura ambiente com TBS-T, 3 vezes durante 15 min e a imunodeteção foi realizada com WesternDot 625 desenvolvido em cabra anti-coelho ou cabra anti-rato *western blot kits* (Invitrogen). As membranas foram visualizadas utilizando Versa Doc Instrument (Bio-Rad Laboratories).

Isolamento de RNA e estudos de expressão genética avaliados por Real-Time PCR (qPCR)

O RNA foi isolado de amostras de tecido congelado com recurso a kits especializados (Axygen, Union City, CA). A produção de RNA total foi quantificada com aparelho de eletroforese automático Experion (Bio-Rad). O cDNA foi produzido utilizando 1 μ g de RNA com kit de cDNA de síntese Bio-Rad iScript. Foram utilizados os seguintes iniciadores, denominados por *primers*, 5'-3' (Gene, Forward primer, Reverse primer) e as respetivas sequências: SirT1, CCA GAT CCT CAA GCC ATG TT, GAT CCT TTG GAT TCC TGC AA SirT3, ATG GAA AGC TGG ATG GAC AG, CCC TGG TCA GCC TTA ACA AA, COX IV, GGC AGA ATG TTG GCT ACC, GCA TAG TCT TCA CTC TTC ACA A, TNF- α , ACT CCC AGA AAA GCA AGC AA, CGA GCA GGA ATG AGA AGA GG, PGC-1 α , CTG CTC TTG AGA ATG GAT ATA CTT, CAT ACT TGC TCT TGG TGG

AA, MnSOD2, CAC TGT GGC TGA GCT GTT GT, TCC AAG CAA TTC AAG CCT CT
NDUFS8, AGT GTA TCT ACT GTG GTT, TAG CTT CTC CTT GTT GTA.

Avaliação histológica

Microscopia ótica

Foram analisadas amostras de tecido hepático obtidas no final do procedimento. As amostras de tecido foram inspecionadas, seccionadas em fatias com 3 a 5 mm de espessura, fixadas em 4 % de formaldeído, e incluídas em parafina. As amostras foram posteriormente seccionadas em cortes de 4 µm e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E, Polysciences, Sakura Autostainer – Prisma 81D). A observação foi efetuada por um patologista experiente, de forma duplamente cega, com recurso a microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i) e as imagens foram obtidas utilizando a câmara Nikon- Digital Sight DS-Fi1.

Microscopia eletrónica de transmissão

Amostras de tecido hepático obtidas no final do procedimento foram fixadas com glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 h. As amostras foram depois lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % durante 1 h. Seguiram-se várias lavagens em tampão, tampão e água destilada e um passo de enxaguamento final em água destilada. As amostras foram depois contrastadas com acetato de uranilo 1 % durante 1 h e lavadas com água destilada. De seguida procedeu-se à desidratação usando uma série ascendente de etanol (30-100 %). Por fim, as amostras foram impregnadas e incluídas em resinas Epoxy (Fluka Analytical) e a polimerização decorreu durante 24 h a 60 °C. Secções ultrafinas (70 nm) foram obtidas em grelhas de cobre e contrastadas com citrato de chumbo 0,2 %, durante 10 min. As observações foram realizadas num microscópio eletrónico de transmissão FEI-Tecnaï G2 Spirit Bio Twin a 80 kV.

Análise estatística

Todas as variáveis contínuas foram apresentadas com média \pm desvio padrão, salvo condição específica. A distribuição de normalidade das variáveis contínuas foi realizada com base no teste de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas contínuas com distribuição normal foram comparadas com o teste *t* de Student e as que não seguem uma distribuição normal foram analisadas com o teste de Mann-Whitney. A comparação entre ≥ 3 grupos foi realizada pelo teste de ANOVA post-hoc para comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS™ (IBM Corp., Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Considerado os resultados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Parte III

RESULTADOS

Capítulo IV

Estudo clínico dos efeitos da I/R na função mitocondrial e metabolismo energético hepático em biópsias humanas de transplante hepático

Das biópsias efetuadas foi possível realizar a avaliação dos parâmetros bioenergéticos mais relevantes para o estudo, tendo sido adicionalmente guardado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ um fragmento de tecido para quantificação de ATP.

Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP

Potencial membranar

O potencial de membrana mitocondrial permite avaliar a capacidade fosforilativa das mitocôndrias isoladas nas biópsias recolhidas imediatamente antes do fígado ser implantado, que corresponde ao término do período de isquemia fria (A), e após a realização das anastomoses da veia porta e da artéria hepática respetivamente, referente ao final do período de isquemia quente e início da reperfusão arterial (B). Estas biópsias foram testadas recorrendo-se para o efeito à utilização de Succinato. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP (Figura 16).

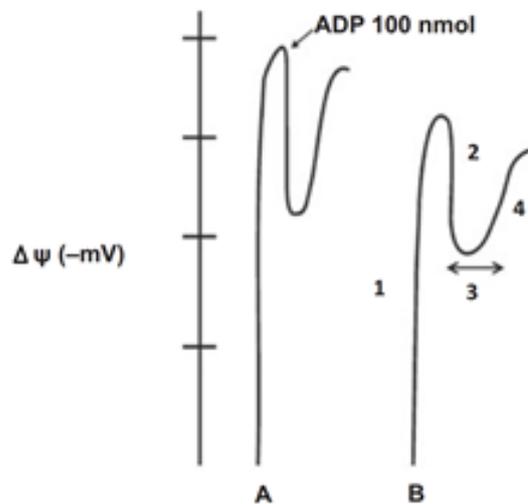


FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS PARÂMETROS DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA TRANSPLANTAÇÃO HEPÁTICA.

Análise de biópsias hepáticas humanas obtidas no final do período de isquemia fria (A) e após reperfusão (B) medidos com elétrodo de TPP⁺. 1- Potencial inicial; 2- Despolarização; 3- Lag phase; 4- Repolarização.

Os dados obtidos mostram uma diminuição estatisticamente significativa de todos os parâmetros medidos nas mitocôndrias isoladas da biópsia B em relação à biópsia A. A *Lag phase* encontra-se bastante aumentada após I/R. Na comparação das médias um $p < 0.05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo. A tabela seguinte resume os resultados obtidos (Tabela 8).

	Succinato		
	Amostra A	Amostra B	Valor de p
Potencial Inicial (-mV)	184,8 ± 3,1	165,9 ± 2,9 *	$p < 0.001$
Despolarização (-mV)	22,9 ± 0,8	15,8 ± 0,5 *	$p < 0.001$
Lag phase (s)	76,2 ± 2,0	127,9 ± 1,3 *	$p < 0.001$
Repolarização (-mV)	181,2 ± 1,4	161,9 ± 1,2 *	$p < 0.001$

TABELA 8- POTENCIAL MEMBRANAR E LAG PHASE DAS MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS DAS BIÓPSIAS

Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi quantificada avaliando o consumo de oxigênio após a utilização de Succinato para energização das mitocôndrias. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela seguinte:

	Succinato		
	Amostra A	Amostra B	Valor de <i>p</i>
Estado 3 (nátomos O/ min/mg proteína)	66,6 ± 1,5	45,0 ± 2,0 *	<i>p</i> <0.001
Estado 4 (nátomos O/ min/mg proteína)	17,9 ± 0,7	20,9 ± 0,6 *	<i>p</i> <0.001
ICR	3,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1 *	<i>p</i> <0.001
ADP/O	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2 *	<i>p</i> <0.001
vFCCP (nátomos O/ min/mg proteína)	130,5 ± 3,4	123,3 ± 4,7 *	<i>p</i> <0.001

TABELA 9- VALORES DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL OBTIDOS NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS DOS TRANSPLANTES HEPÁTICOS

A quantificação da respiração mitocondrial hepática nas biópsias A e B, quando estimuladas com Succinato. Na comparação das médias um *p* <0.05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Quantificação de ATP

O seguinte gráfico mostra a quantificação de ATP nas amostras A e B quando estimuladas com Succinato (Figura 17).

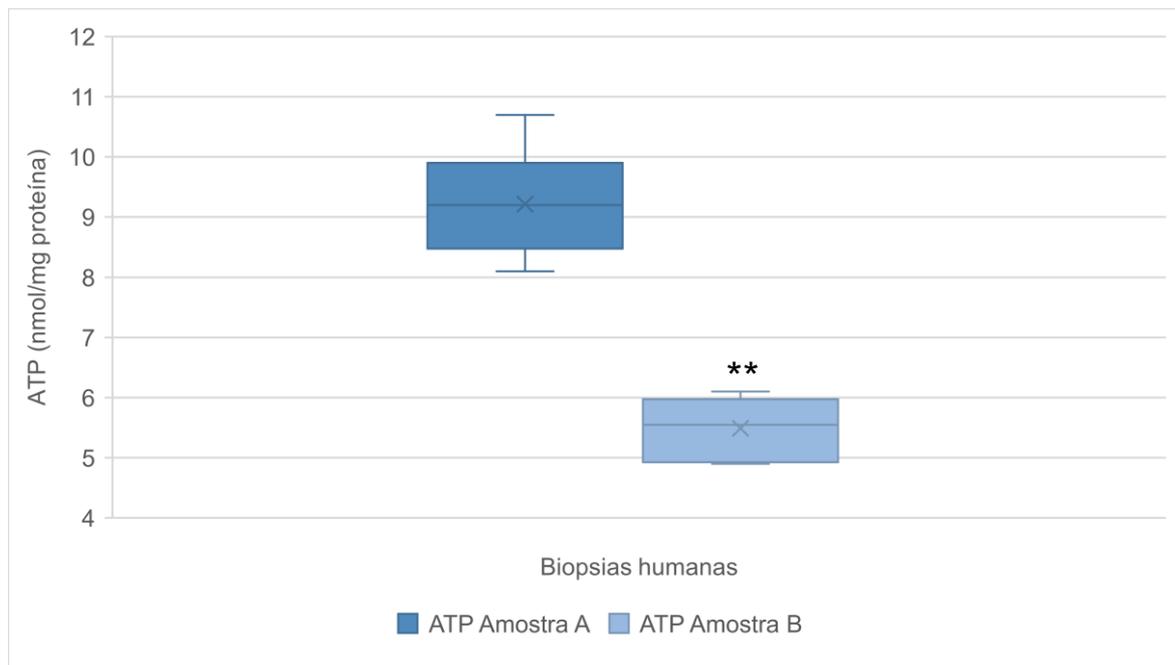


FIGURA 17- GRÁFICO REPRESENTATIVO DOS VALORES DA QUANTIFICAÇÃO DE ATP PRESENTE NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS DOS TRANSPLANTES HEPÁTICOS
Quantificação de ATP presente no tecido hepático nas biópsias A ($9,3 \pm 0,7$) e B ($5,7 \pm 0,7$). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,001$.

Tempos de isquemia/reperfusão e função mitocondrial

Foram avaliadas as diferenças nos tempos de isquemia fria, isquemia quente e do período pós-reperfusão arterial até à conclusão do transplante hepático. Constatou-se que ocorre maior variabilidade na duração dos tempos de isquemia fria ($\Delta \alpha$, $5h31 \text{ min} \pm 1h10 \text{ min}$), quando comparados com a variação da duração dos tempos de isquemia quente ($\Delta \beta$, $1h54 \text{ min} \pm 24 \text{ min}$), valores estes que são mais uniformes (Figura 18).

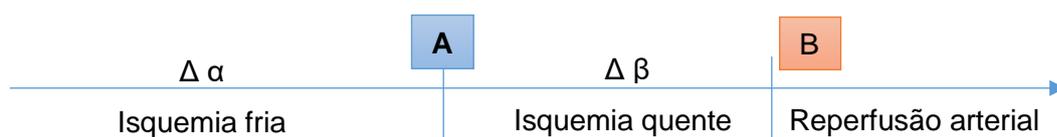


FIGURA 18- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VARIAÇÕES DOS TEMPOS DE ISQUEMIA FRIA, ISQUEMIA QUENTE E REPERFUSÃO ARTERIAL ATÉ À CONCLUSÃO DO TRANSPLANTE HEPÁTICO

A análise comparativa da relação entre os tempos de isquemia fria, isquemia quente e tempo total de cirurgia com os diversos parâmetros das variações bioenergéticas mitocondriais entre as amostras A e B não mostra relação entre a disfunção bioenergética mitocondrial e as variações nos tempos de I/R (Tabela 10 e 11).

	Δ Potencial	Δ Despolarização	Δ Lag phase	Δ Repolarização
Tempo de Isquemia Fria	$r=-0,146$	$r=0,294$	$r=0,194$	$r=-0,041$
Tempo de Isquemia Quente	$r=-0,235$	$r=0,288$	$r=0,060$	$r=-0,336$
Tempo Total de Cirurgia	$r=-0,276$	$r=0,003$	$r=0,070$	$r=-0,059$

TABELA 10- CORRELAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DE ISQUEMIA FRIA, ISQUEMIA QUENTE E TEMPO TOTAL DA INTERVENÇÃO CIRÚRGICA COM AS VARIAÇÕES NOS PARÂMETROS DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Não se verifica correlação entre os diversos parâmetros da função bioenergética mitocondrial e os tempos estudados, para $p < 0.05$.

	Δ Estado 3	Δ Estado 4	Δ ICR	Δ ADP/O	Δ FFCP
Tempo de Isquemia Fria	$r=0,089$	$r=-0,113$	$r=0,074$	$r=0,151$	$r=-0,112$
Tempo de Isquemia Quente	$r=0,109$	$r=-0,104$	$r=0,008$	$r=-0,177$	$r=-0,395$
Tempo Total de Cirurgia	$r=-0,091$	$r=0,144$	$r=-0,224$	$r=0,105$	$r=-0,244$

TABELA 11- CORRELAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DE ISQUEMIA FRIA, ISQUEMIA QUENTE E TEMPO TOTAL DA INTERVENÇÃO CIRÚRGICA COM AS VARIAÇÕES NOS PARÂMETROS DE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

Ausência de correlação entre os diversos parâmetros de respiração mitocondrial e os tempos de I/R, para $p < 0.05$.

Função mitocondrial e biomarcadores da função hepatocelular e necrose

A atividade bioenergética mitocondrial apresenta várias correlações com significado estatístico com os marcadores pós-operatórios de necrose hepatocelular (TGO e TGP nos 1^o, 3^o e 5^o dias) e da função hepática (lactato arterial 0 h, INR no 3^o dia e bilirrubina direta no 1^o, 5^o e 7^o dias).

As correlações mais significativas foram observadas com: a variação da Lag phase e os valores de TGO 1^o dia ($r=0,596$, $p=0,007$) e TGO 3^o dia ($r=0,630$, $p=0,004$); variações de ICR com lactato arterial 0 h ($r=-0,587$, $p=0,008$), bilirrubina direta 1^o dia ($r=-0,837$, $p=0,009$), bilirrubina 5^o dia ($r=-0,682$, $p=0,03$) e bilirrubina 7^o dia ($r=-0,855$, $p=0,002$) (Tabela 12).

	0h Lactato arterial	Clearance Lactato arterial	1º dia TGO	1º dia TGP	1º dia Bilirrubina	3º dia TGO	3º dia TGP	3º dia INR	5º dia TGO	5º dia TGP	5º dia Bilirrubina	7º dia Bilirrubina
VarPotBA	r=0,057	r=0,027	r=-0,095	r=-0,094	r=-0,240	r=-0,260	r=-0,054	r=-0,264	r=-0,541*	r=-0,092	r=-0,188	r=0,176
VARDespBA	r=0,150	r=0,165	r=0,282	r=0,282	r=0,206	r=0,280	r=0,292	r=0,235	r=0,134	r=0,320	r=0,116	r=0,268
VARLagphaseBA	r=0,100	r=0,093	r=0,596**	r=0,393	r=0,491	r=0,630**	r=0,381	r=0,519*	r=0,477*	r=0,384	r=0,243	r=0,298
VARRepBA	r=0,252	r=0,207	r=-0,061	r=-0,145	r=0,235	r=-0,067	r=-0,217	r=0,000	r=-0,112	r=-0,289	r=-0,162	r=0,098
Var3B-3A	r=-0,254	r=-0,254	r=-0,065	r=0,135	r=-0,491	r=-0,202	r=0,140	r=-0,200	r=-0,011	r=0,261	r=-0,517	r=-0,675*
VarEst 4B-4A	r=0,311	r=0,272	r=0,289	r=0,327	r=0,590	r=0,217	r=0,159	r=0,422	r=0,123	r=0,141	r=0,354	r=0,549
VarICR BA	r=-0,587**	r=-0,566*	r=-0,390	r=-0,275	r=-0,837**	r=-0,393	r=-0,157	r=-0,227	r=-0,199	r=-0,053	r=-0,682*	r=-0,855**
VarADP/0 BA	r=-0,071	r=-0,044	r=-0,004	r=-0,210	r=-0,090	r=0,136	r=-0,129	r=0,117	r=0,115	r=-0,192	r=0,290	r=0,128
VarvFCCP BA	r=0,179	r=0,110	r=-0,367	r=-0,461*	r=-0,252	r=-0,377	r=-0,463*	r=-0,100	r=-0,444	r=-0,472*	r=-0,237	r=0,152
VarATPBA	r=0,265	r=0,267	r=-0,259	r=-0,168	r=0,527	r=-0,188	r=-0,169	r=-0,048	r=-0,059	r=-0,150	r=0,182	r=0,091

TABELA 12- FUNÇÃO MITOCONDRIAL E FUNÇÃO HEPÁTICA PÓS-OPERATÓRIA

As correlações entre as variações dos parâmetros bioenergéticos e os marcadores de função hepatocelular e de necrose. Consideram-se correlações estatisticamente significativas para valores $p < 0.05$ (*); ** $p < 0.01$.

Função mitocondrial e resultados pós-operatórios

No estudo clínico verificou-se correlação entre a variação do estado 3 respiratório e a morbidade tardias (> 30 dias) ($r=-0,533$, $p =0,019$). Da correlação dos restantes parâmetros de função mitocondrial com a morbidade precoce (≤ 30 dias), morbidade tardia (> 30 dias) e mortalidade, não se identificaram quaisquer alterações estatisticamente significativas (Tabela 13 e 14). Associadamente também não foram encontradas correlações entre as variáveis bioenergéticas mitocondriais e os dias de internamento.

	Δ Potencial	Δ Despolarização	Δ Lag phase	Δ Repolarização
Complicações precoces	$r = 0,047$	$r = -0,342$	$r = -0,071$	$r = -0,047$
Complicações tardias	$r = -0,125$	$r = -0,110$	$r = 0,000$	$r = -0,016$
Mortalidade	$r = 0,000$	$r = -0,408$	$r = -0,376$	$r = -0,204$

TABELA 13- CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIAÇÕES DE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E MORBILIDADE PRECOCE, MORBILIDADE TARDIA E MORTALIDADE

As correlações entre as variações de potencial de membrana mitocondrial e os parâmetros de morbidade precoce, tardia e de mortalidade. Consideram-se correlações estatisticamente significativas para valores $p < 0.05$.

	Δ Estado 3	Δ Estado 4	Δ ICR	Δ ADP/O	Δ FFCP
Complicações precoces	$r = -0,377$	$r = -0,012$	$r = -0,024$	$r = 0,036$	$r = 0,024$
Complicações tardias	$r = -0,533^*$	$r = -0,063$	$r = -0,048$	$r = 0,223$	$r = 0,157$
Mortalidade	$r = -0,094$	$r = -0,173$	$r = 0,334$	$r = -0,016$	$r = 0,063$

TABELA 14- CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIAÇÕES DE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL E MORBILIDADE PRECOCE, MORBILIDADE TARDIA E MORTALIDADE

As correlações entre as variações de respiração mitocondrial e os parâmetros de morbidade precoce, tardia e de mortalidade. Consideram-se correlações estatisticamente significativas para valores $p < 0.05$ (*).

Discussão

O fígado é um órgão complexo onde se processam múltiplas funções de síntese e de secreção. Constituído maioritariamente por hepatócitos também apresenta outros elementos celulares sendo de destacar: as células epiteliais dos ductos biliares, as células endoteliais sinusoidais hepáticas e as células de Kupffer. Para o seu normal funcionamento, o fígado necessita de níveis elevados de oxigénio, de modo a manter os seus processos de síntese e de eliminação de substâncias tóxicas, tornando-o extremamente suscetível aos processos de I/R.

A I/R hepática é um fenómeno inerente à cirurgia hepática, no qual todos os elementos celulares que o constituem, vão ser sujeitos a um contacto rápido e prolongado com o ambiente externo, que sob várias condições patológicas podem levar a alterações na atividade mitocondrial, a processos de autofagia e de apoptose celular [146].

Contrariamente à cirurgia hepática (hepatectomias major e minor), na transplantação hepática, o processo de isquemia quente/reperfusão é precedido por um período de isquemia fria, no qual o órgão é mantido numa solução de preservação a 4 °C, por um período variável de tempo [147].

Foram conduzidos múltiplos estudos, em modelos animais quer *in vivo* quer *ex vivo*, de modo a tentar avaliar o eventual impacto do processo de I/R na disfunção mitocondrial hepática [148].

A originalidade do presente estudo clínico assenta em demonstrar pela primeira vez em tecido hepático vivo proveniente de fígados humanos utilizados na transplantação hepática, o eventual efeito do processo de I/R na atividade mitocondrial, permitindo deste modo comparar se os eventos que ocorrem no ser humano são sobreponíveis ao documentado nos modelos animais utilizados até à data.

Neste estudo foram processadas duas biópsias hepáticas, designadas por A (no final da isquemia fria) e B (realizada 1 h após a última anastomose que no presente estudo correspondeu à anastomose da artéria hepática). De lembrar que os estudos da atividade bioenergética mitocondrial implicam a realização de ensaios em tecidos vivos, pelo que as biópsias foram imediatamente processadas no laboratório.

Foram estudados múltiplos parâmetros da função mitocondrial e da atividade bioenergética. Do estudo comparativo das amostras, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variações dos diversos parâmetros

de potencial de membrana mitocondrial, de respiração mitocondrial e de ATP, confirmando o compromisso da função mitocondrial no contexto específico da transplantação hepática, permitindo concluir que no ser humano a disfunção mitocondrial hepática está intimamente implicada com o fenómeno de I/R.

Nos estudos realizados, maioritariamente envolvendo modelos animais, identificaram-se diferenças nos mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos processos de isquemia fria e de isquemia quente [149]. Pretendeu-se avaliar se as diferenças da função mitocondrial e da atividade bioenergética estavam relacionadas com variações quer dos tempos de isquemia fria quer de isquemia quente. Da análise estatística dos dados não foi observada qualquer correlação entre as variações dos tempos de isquemia fria, quente e tempo total da intervenção cirúrgica com as variações dos diferentes parâmetros de atividade mitocondrial. De acordo com o que ocorre nos modelos animais, sabe-se que no período de isquemia quente/reperfusão a lesão induzida pela isquemia é amplificada afetando preferencialmente os hepatócitos, enquanto que as células endoteliais sinusoidais hepáticas são mais suscetíveis aos efeitos induzidos pela preservação numa solução fria, que ocorre durante o período de isquemia fria [150].

No contexto da transplantação hepática existe uma maior variabilidade no tempo de isquemia fria, dado que o órgão é mantido na solução de preservação e só é retirado da solução de preservação mantida no gelo após a realização da hepatectomia total do recetor e quando estão criadas as condições consideradas ideais para se iniciar a realização das anastomoses vasculares. Consequentemente no humano o tempo de isquemia quente é mais curto e ao mesmo tempo menos variável entre os doentes (tempo médio de 2 h no estudo clínico). Por sua vez, o tempo de isquemia fria variou entre 2 a 8 h, encontrando-se sempre abaixo das 12 h, tempo que na atualidade se considerada como o máximo para a utilização do fígado para transplante. Tendo em consideração estes aspetos, é expectável a ausência de correlação entre as variáveis tempo de I/R e as variações dos dados referentes à função mitocondrial, que podem ser explicados por um lado pela pequena variação dos tempos de isquemia fria e por outro porque a biópsia foi realizada 1 h após a reperfusão (fase precoce, menos de 2 h), o que provavelmente não é suficiente para permitir correlacionar o tempo de I/R com as alterações identificadas nos parâmetros de função mitocondrial [151].

Dado tratar-se de um estudo clínico no âmbito da transplantação hepática humana, existem limitações inerentes a este tipo de estudo de modo a não condicionar os

resultados dos doentes submetidos a transplante hepático. Como curiosidade meramente científica e de modo a esclarecer a eventual correlação entre o efeito da isquemia quente/reperfusão sobre a atividade mitocondrial, seria interessante prolongar o tempo de isquemia quente/reperfusão ou realizar nova biópsia hepática (1 cm por 1 cm) numa fase tardia, após a realização do transplante hepático (fase tardia, 6 a 48h pós-transplante).

Os resultados clínicos demonstram uma relação estatisticamente significativa entre a bioenergética mitocondrial e os marcadores clínicos pós-operatórios de necrose celular. Existe uma correlação moderada entre a variação da Lag phase e os valores de TGO registados no 1^o e no 3^o dia de pós-operatório. Esta correlação reflete um aumento da necrose hepatocelular desencadeada pelo défice bioenergético condicionado por alterações no processo de fosforilação oxidativa.

Verifica-se também uma relação estatisticamente significativa entre a disfunção mitocondrial e o valor de bilirrubina direta no 1^o, 5^o e 7^o dias de pós-operatório, que é um marcador da função hepatocelular [152, 153].

Identifica-se simultaneamente uma correlação moderada entre as variações do índice de controlo respiratório e os valores de lactato arterial no final da intervenção cirúrgica e de *clearance* de lactato arterial. De referir que o lactato arterial é um importante marcador da função hepática e que o aumento do lactato arterial reflete uma disfunção ao nível do ciclo de Cori, que é mais um indicador de disfunção mitocondrial hepática [43, 154, 155].

Avaliando a relação existente entre os dados de bioenergia mitocondrial identificou-se correlação entre a variação do estado 3 respiratório com as complicações tardias. Nos restantes resultados não se verificou correlação entre as variáveis da bioenergia mitocondrial e a morbilidade, mortalidade e os dias de internamento.

Este estudo clínico possibilitou a identificação, pela primeira vez, do envolvimento da disfunção mitocondrial hepática no processo de I/R no contexto da transplantação hepática, permitindo determinar alguns marcadores de função hepática e de necrose hepatocelular implicados, que podem vir a ser utilizados como fatores de prognóstico da disfunção mitocondrial hepática e das alterações do equilíbrio bioenergético dos fígados transplantados. A identificação destes mecanismos faculta por um lado a validação dos modelos animais existentes e por outro a promoção do desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas de modo a mitigar o efeito da I/R na atividade mitocondrial.

Serão necessários mais estudos, para confirmar a futura aplicabilidade destes marcadores clínicos como fatores de prognóstico da atividade mitocondrial, dado que podem permitir a identificação precoce de falência hepática pós-transplante e antecipar medidas terapêuticas que possam minorar o risco de morbimortalidade pós-transplante ou antecipar a necessidade de realizar um novo transplante.

Capítulo V

Estudo experimental do efeito da I/R (I) e da reperfusão hipotérmica (II) na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático

Efeito da I/R na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático (I)

No início do projeto foram realizados vários protocolos de I/R, tendo em vista a otimização do modelo a utilizar nos estudos posteriores. Foram realizados múltiplos ensaios, tendo sido testados tempos de isquemia fria que foram agrupados do seguinte modo: grupo A (3 h), grupo B (6 h), grupo C (12 h) e grupo D (18 h).

Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP

Potencial membranar

Os dados obtidos com Succinato revelam uma diminuição estatisticamente significativa de todos os parâmetros medidos entre as biópsias realizadas. A *Lag phase* encontra-se aumentada nos animais após o período de reperfusão independentemente das variações dos tempos de isquemia fria, o que reforça os dados de medição dos potenciais (Figura 19 e 20).

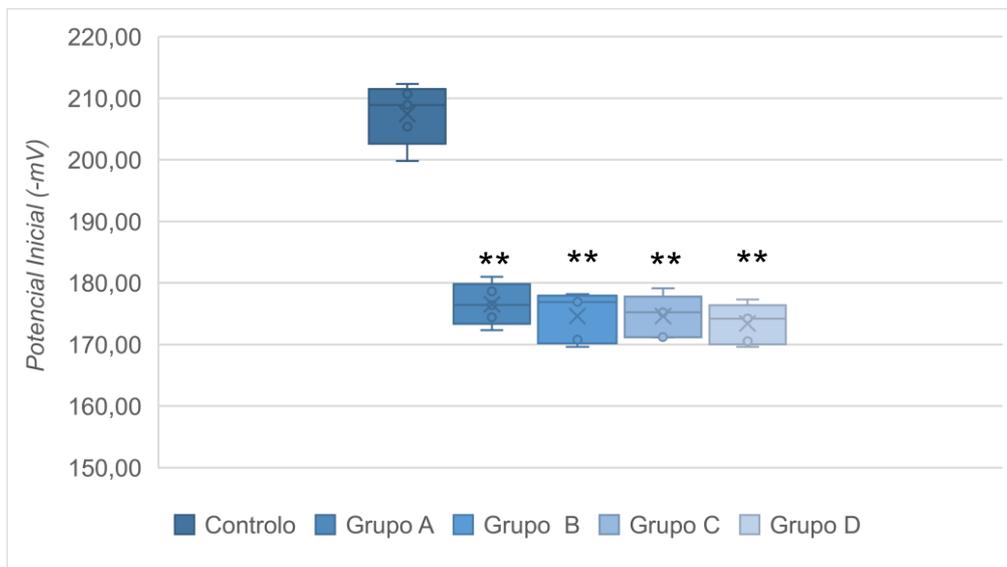


FIGURA 19- GRÁFICO DA MEDICAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA INICIAL ($\Delta\psi$) NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS NOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

O $\Delta\psi$ foi determinado na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo de controlo e os vários grupos, mas ausência de diferenças com significado estatístico entre os grupos (A a D). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

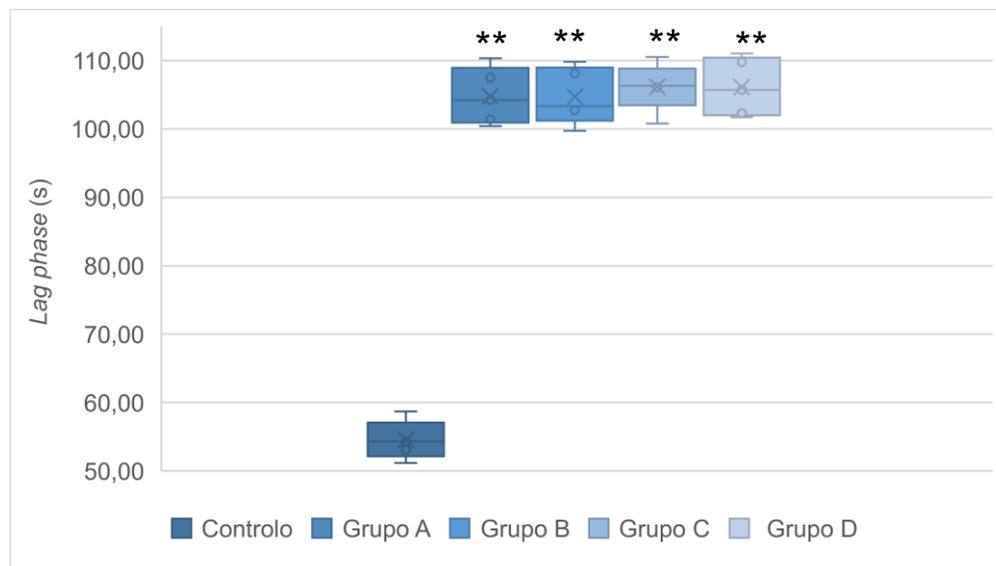


FIGURA 20- GRÁFICO DA MEDICAÇÃO DA LAG PHASE NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS NOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

A Lag phase foi determinado na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo de controlo e os vários grupos, mas ausência de diferenças com significado estatístico entre os grupos (A a D). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi medida avaliando o consumo de oxigênio após energização das mitocôndrias com Succinato. Apesar das diferenças nos tempos de isquemia fria entre os grupos de animais, observou-se que após a reperusão, os valores do Estado 3 e ICR encontram-se diminuídos, indicador de um decréscimo da eficiência fosforilativa das mitocôndrias. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela seguinte (Figura 21 e 22).

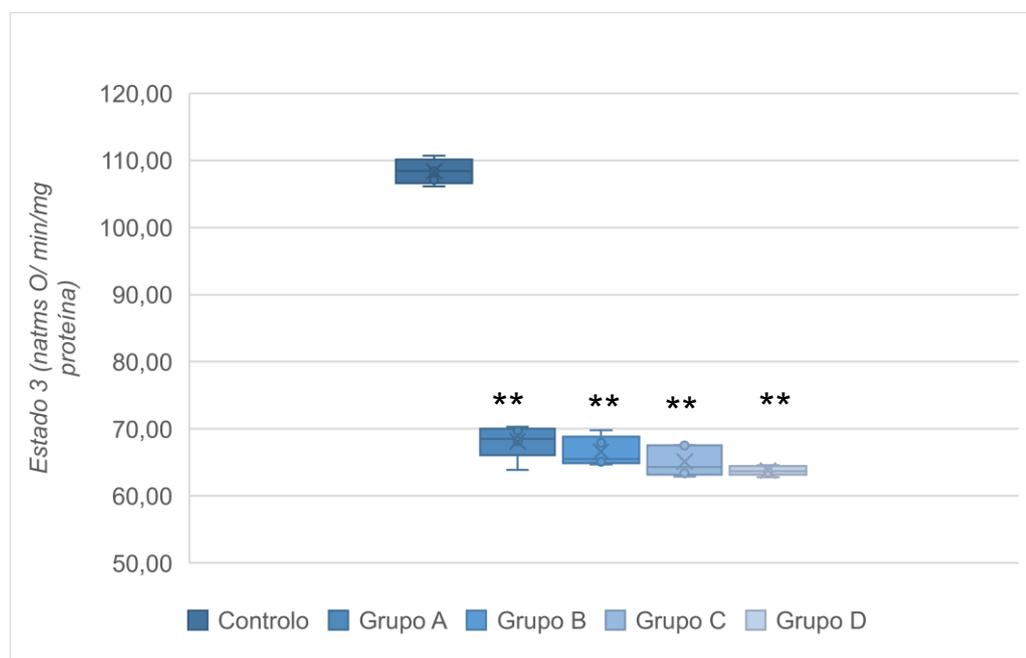


FIGURA 21- REPRESENTAÇÃO DO ESTADO 3 RESPIRATÓRIO MITOCONDRIAL NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS NOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

Determinação do estado 3 respiratório mitocondrial na presença de Succinato como substrato respiratório. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo de controlo e os vários grupos, mas ausência de diferenças com significado estatístico entre os grupos (A a D). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

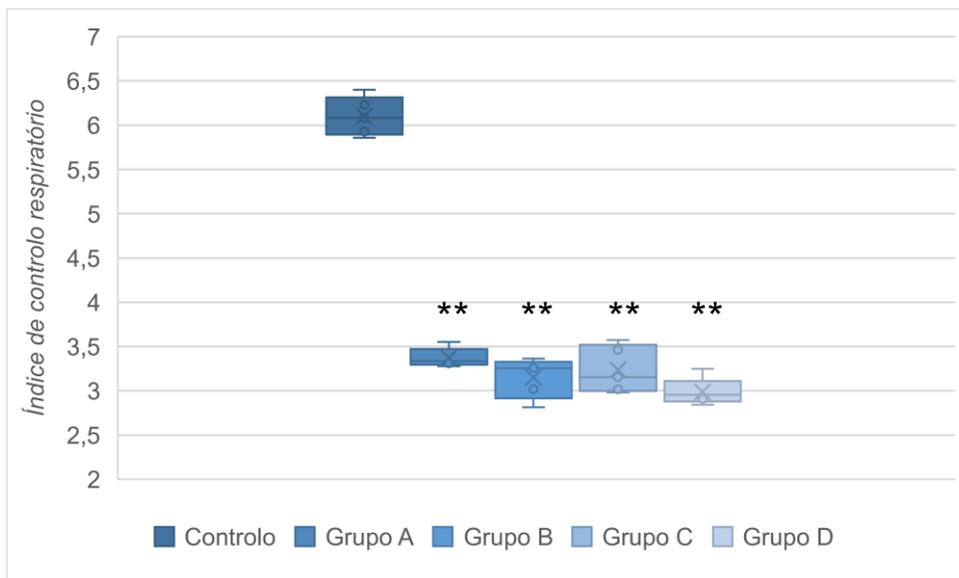


FIGURA 22- REPRESENTAÇÃO DO ÍNDICE DE CONTROLO RESPIRATÓRIO NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS NOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

Determinação do índice de controlo respiratório na presença de Succinato como substrato respiratório. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo de controlo e os vários grupos, mas ausência de diferenças com significado estatístico entre os grupos (A a D). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Efeito da reperfusão hipotérmica na função mitocondrial e no metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático (II)

Foram avaliados os eventuais efeitos na função mitocondrial e na atividade bioenergética realizando uma reperfusão em condições de hipotermia. Procedeu-se à realização de múltiplos ensaios, nos quais foram mantidos os tempos de isquemia fria (12 h) e de reperfusão (1 h). Nestes ensaios a reperfusão do grupo A foi realizada a 32 °C, enquanto que no grupo B a reperfusão foi a 37 °C.

Bioenergética mitocondrial: potencial membranar, respiração mitocondrial e quantificação de ATP

Potencial membranar

Para a obtenção dos dados de potencial membranar foi utilizado o Succinato. De acordo com os resultados, identificou-se uma melhoria dos parâmetros de função mitocondrial após a realização de reperfusão hipotérmica comparativamente com o grupo submetido a reperfusão normotérmica, e que essa diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,001$). De notar, que a *Lag phase* encontra-se diminuída no grupo da reperfusão hipotérmica comparativamente com o grupo de reperfusão normotérmica, corroborando os dados de medição dos potenciais (Tabela 15).

	Succinato		
	Controlo	Grupo A	Grupo B
Potencial Inicial (-mV)	207,4 ± 5,0	199,6 ± 1,5	176,4 ± 2,3**
Despolarização (-mV)	24,0 ± 1,0	21,7 ± 1,1	16,9 ± 0,8**
Lag phase (s)	54,6 ± 2,8	60,8 ± 1,0	104,4 ± 4,1**
Repolarização (-mV)	194,7 ± 7,7	189,8 ± 5,1	172,6 ± 2,1**

TABELA 15- COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE POTENCIAL MEMBRANAR E LAG PHASE ENTRE O GRUPO A (REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA) E O GRUPO B (REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA)

O $\Delta\psi$ e a *lag phase* foram determinados na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

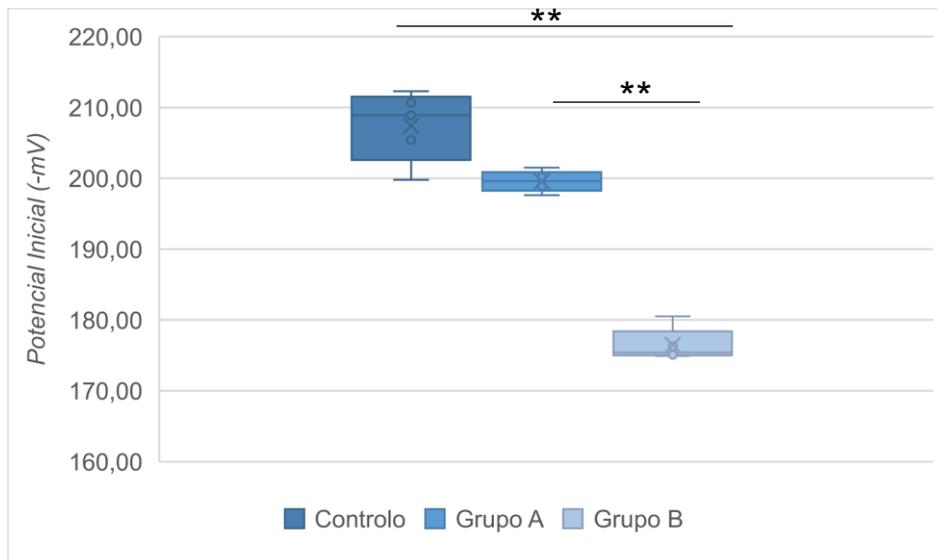


FIGURA 23- GRÁFICO DA MEDICAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA INICIAL ($\Delta\psi$) ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA) E O GRUPO B (REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA).

O $\Delta\psi$ foi determinado na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

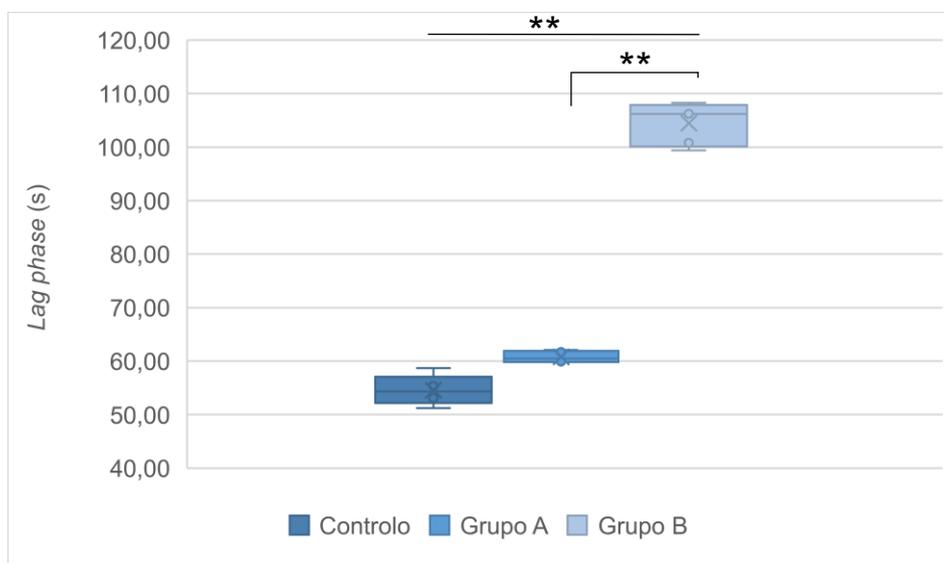


FIGURA 24- GRÁFICO DA MEDICAÇÃO DA LAG PHASE ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA) E O GRUPO B (REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA).

A Lag phase foi determinado na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A (reperfusão hipotérmica) e o grupo B (reperfusão normotérmica). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi medida avaliando o consumo de oxigênio após energização das mitocôndrias com Succinato. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela seguinte (Tabela 16).

	Succinato		
	Grupo A	Grupo B	Valor de <i>p</i>
Estado 3 (nátomos O/ min/mg proteína)	96,0 ± 4,4	65,4 ± 1,4	<i>p</i> <0.001
Estado 4 (nátomos O/ min/mg proteína)	17,2 ± 0,6	20,9 ± 0,2	<i>p</i> <0.001
ICR	5,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1	<i>p</i> <0.001
ADP/O	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	<i>p</i> >0.05
vFCCP (nátomos O/ min/mg proteína)	123,7 ± 2,0	122,0 ± 2,5	<i>p</i> >0.05

TABELA 16- VALORES DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL OBTIDOS NAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS DOS GRUPOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA E NORMOTÉRMICA.

A quantificação da respiração mitocondrial hepática nos grupos A (reperfusão hipotérmica) e no grupo B (reperfusão normotérmica), quando estimuladas com Succinato. Na comparação das médias um *p* <0.05 (*) foi considerado estatisticamente significativo.

Da análise dos resultados observa-se que no grupo onde se realizou a reperfusão hipotérmica, os valores do Estado 3 e ICR encontram-se aumentados quando comparados com o grupo submetido a reperfusão normotérmica, e que essas diferenças têm significado estatístico (*p* <0.001). Este indicador permite afirmar que a reperfusão em condições de hipotermia, ao preservar a eficiência fosforilativa das mitocôndrias, confere um efeito protetor sobre as lesões induzidas pela I/R sobre a atividade mitocondrial (Figura 25 e 26).

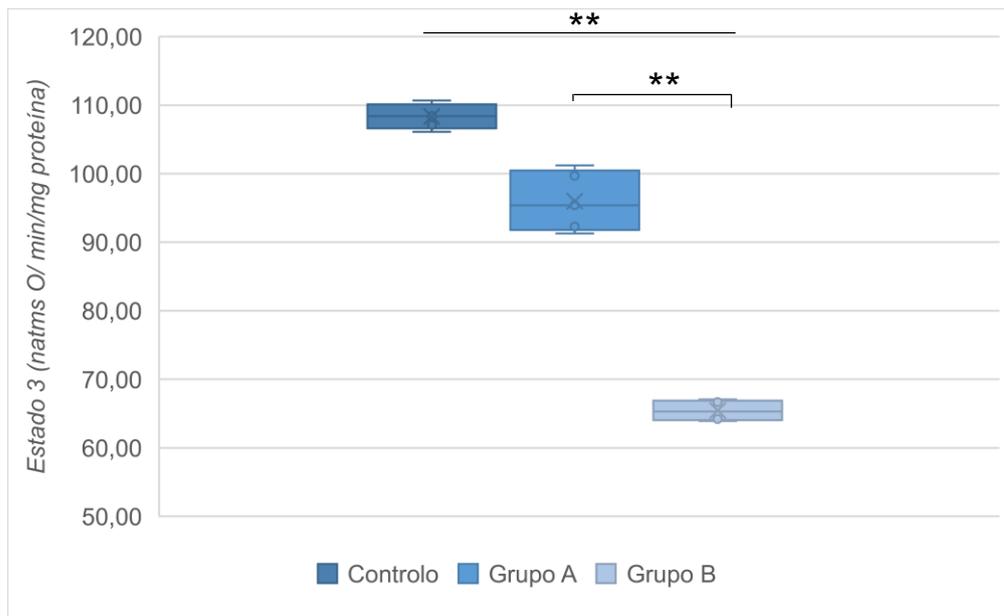


FIGURA 25- REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DE ESTADO 3 RESPIRATÓRIO OBTIDOS ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA) E O GRUPO B (REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA).

Determinação do estado 3 respiratório na presença de Succinato como substrato respiratório. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A e o B. Na comparação das médias um $p < 0.05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

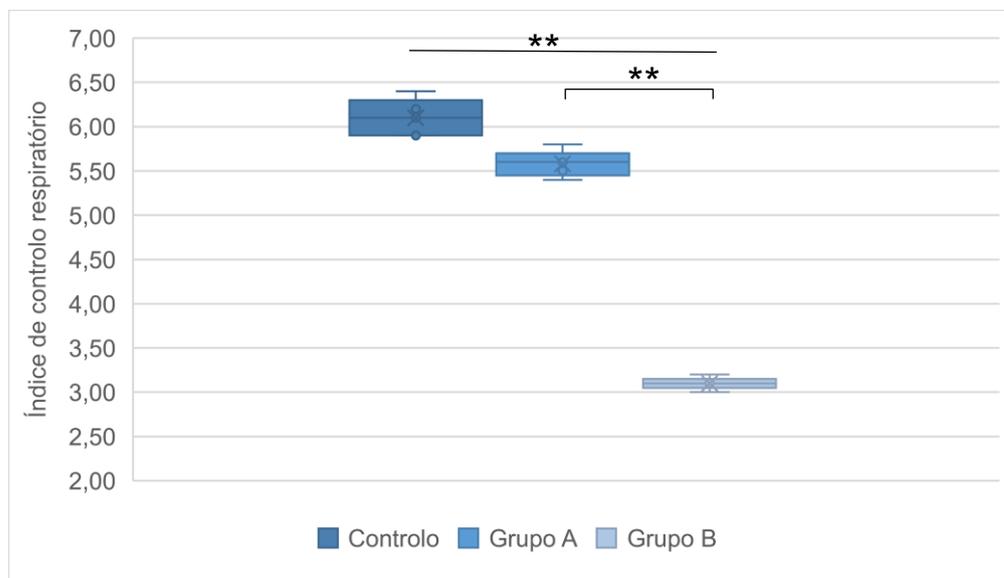


FIGURA 26- REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DE ÍNDICE DE CONTROLO RESPIRATÓRIO OBTIDOS ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA) E O GRUPO B (REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA).

Determinação do índice de controlo respiratório na presença de Succinato como substrato respiratório. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A e o B. Na comparação das médias um $p < 0.05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Quantificação de ATP

O seguinte gráfico reporta aos valores de ATP determinado no tecido hepático nos grupos submetidos a reperfusão hipotérmica e normotérmica. Da análise dos dados, constata-se que após o período de reperfusão normotérmica, as mitocôndrias apresentam um menor conteúdo em ATP, que conduz a uma diminuição da sua eficiência energética (Figura 27).

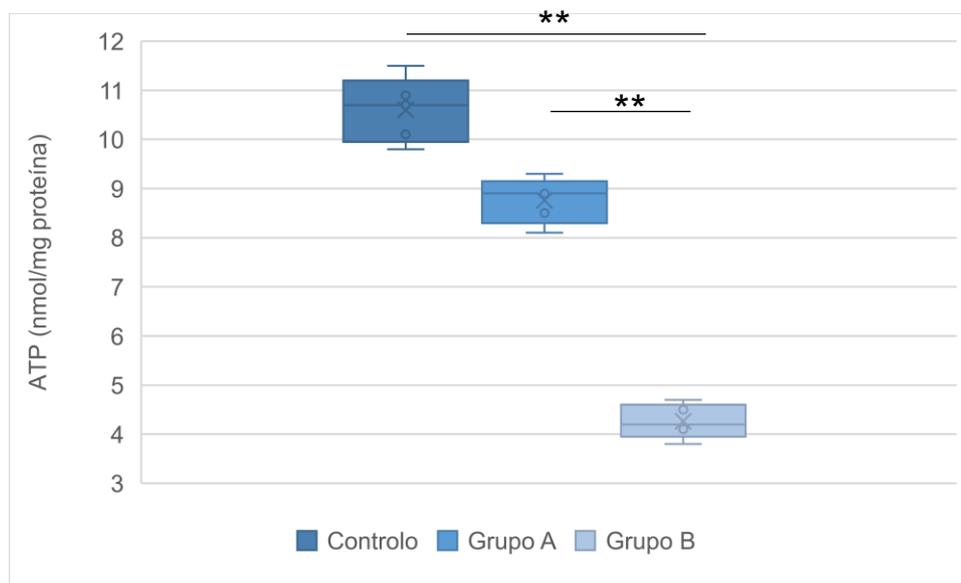


FIGURA 27- GRÁFICO REPRESENTATIVO DOS VALORES DA QUANTIFICAÇÃO DE ATP OBTIDOS ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA) E O GRUPO B (REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA).

Quantificação dos valores de ATP presentes no tecido hepático no grupo controlo e nos grupos A (reperfusão hipotérmica) e B (reperfusão normotérmica). De referir a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos A e B. Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Avaliação histológica

Microscopia ótica

Apresentamos o resultado da avaliação histológica após realização de reperfusão hipotérmica (Grupo A) e normotérmica (Grupo B) (Figura 28 a 30).

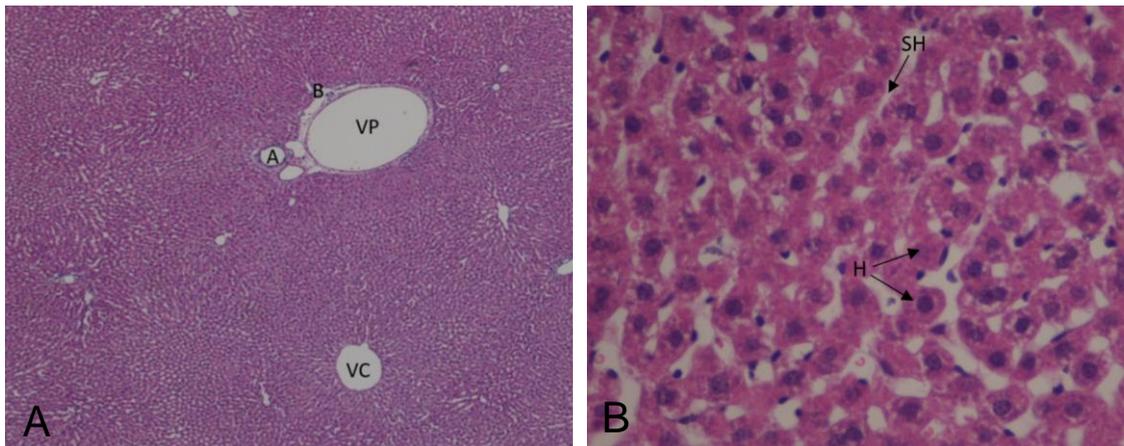


FIGURA 28- CONTROLO. MICROSCOPIA ÓTICA DE TECIDO HEPÁTICO COM ARQUITETURA PRESERVADA.

Espaço porta constituído pela veia porta (VP), artéria hepática (A) e ducto biliar (B), sem lesão dos seus constituintes. Veia centrolobular (VC). Sinusóides hepáticos (SH) sem dilatação nem lesão endotelial. Hepatócitos (H) com preservação do núcleo e dos organelos intracelulares, sem apoptose nem necrose. (A- H&E, ampliação de 40x; B- H&E, ampliação de 400x).

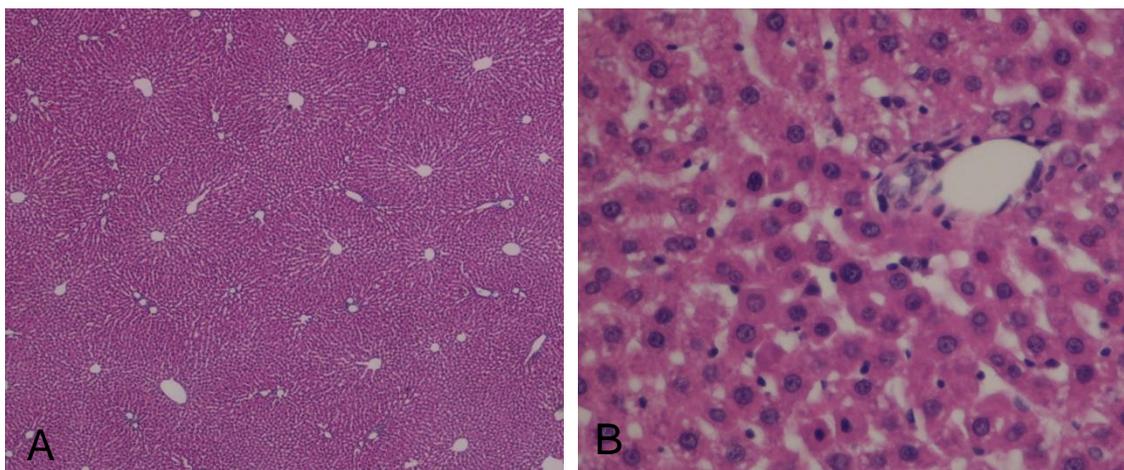


FIGURA 29- MICROSCOPIA ÓTICA DE TECIDO HEPÁTICO. REPERFUSÃO HIPOTÉRMICA.

Sinusóides hepáticos sem dilatação nem lesão endotelial. Hepatócitos com preservação do núcleo e dos organelos intracelulares, sem sinais de apoptose ou necrose. (A- H&E, ampliação de 40x; B- H&E, ampliação de 400x).

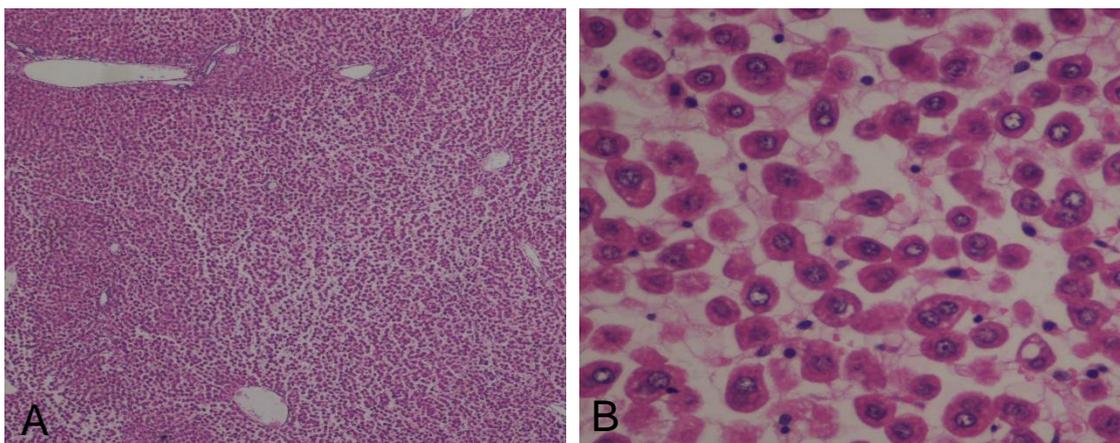


FIGURA 30- MICROSCOPIA ÓTICA DE TECIDO HEPÁTICO. REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA. Parênquima hepático com arquitetura preservada com espaços porta sem lesões dos seus constituintes. Observa-se descoesão moderada a marcada dos hepatócitos, por vezes arredondados e com discreta balonização. Preservação do núcleo e dos organelos. Não se identificou necrose nem apoptose. (A- H&E, ampliação de 40x; B- H&E, ampliação de 400x)

Discussão

Os modelos animais de transplantação hepática têm sido uma ferramenta fundamental para a compreensão dos mecanismos biológicos e imunológicos envolvidos na transplantação e assim responder a questões de interesse clínico.

O animal maioritariamente utilizado é o rato, tendo para tal sido desenvolvidos vários modelos. Em 1973, Lee et al, relataram o primeiro transplante hepático ortotópico no rato, que consistia na realização de um shunt extracorpóreo entre a veia porta e a jugular no recetor e posterior anastomose do implante à veia hepática, à veia porta e à aorta do recetor [156]. Esta técnica extremamente complexa foi abandonada e só 18 anos mais tarde, com o desenvolvimento de técnicas de microcirurgia de anastomose vascular, Qian et al, desenvolveram um complexo modelo animal de transplante hepático ortotópico. As investigações baseadas neste modelo são muito restritas, pois obriga a elevada perícia microcirúrgica e à dotação de condições técnicas muito específicas. Outra das limitações da utilização deste modelo animal está relacionada com a elevada taxa de mortalidade observada nos ratos, como resultado da interferência do procedimento ao nível da função hepatocelular [157, 158].

Baseado nos estudos desenvolvidos por Oscar Langendorff, nos quais eram avaliados eventos fisiológicos e fisiopatológicos do coração ex vivo, foram desenvolvidos outros modelos animais que permitiam a avaliação do fígado ex vivo, sendo de salientar os estudos de I/R [61, 159, 160].

Atualmente na área da transplantação hepática, os estudos do fígado ex vivo têm sido extremamente valiosos, pois têm possibilitado a realização de estudos fisiológicos e fisiopatológicos, fundamentais para o desenvolvimento de novos processos de preservação do fígado, através da utilização de máquinas de preservação dinâmica. O desenvolvimento da preservação dinâmica poderá alterar a forma como os órgãos são perfundidos, preservados e transportados [161-166].

No presente estudo, com o objetivo de realizar uma investigação com carácter translacional, tentámos perceber, no modelo animal, se o efeito da variação nos tempos de isquemia fria seria sobreponível ao que ocorre no humano, quer do ponto de vista da função mitocondrial quer da atividade bioenergética.

Os estudos de potencial de membrana mitocondrial e *lag phase* permitiram mostrar que existem diferenças estatisticamente significativas entre as biópsias realizadas no final

do período de isquemia fria e após reperfusão em todos os grupos estudados. Por sua vez, da análise comparativa dos diferentes grupos entre si, não foram identificadas diferenças com significado estatístico. Estes dados permitem demonstrar que no modelo animal a função mitocondrial é afetada pelo processo de I/R, acrescentando ao facto de que no modelo animal a disfunção mitocondrial foi independente das variações dos tempos de isquemia fria estudados.

A *Lag phase* encontra-se aumentada após a reperfusão em todos os grupos de animais, o que reforça os dados obtidos da medição dos potenciais de membrana.

Os estudos da atividade respiratória mitocondrial apresentaram alterações, sendo de salientar o decréscimo em todos os grupos, do estado 3 e do índice de controlo respiratório.

Da avaliação da atividade bioenergética foi possível observar uma diminuição da quantidade de ATP produzido em todos os tempos de isquemia fria estudados, demonstrando-se que durante a reperfusão ocorre lesão mitocondrial.

As avaliações funcionais da atividade mitocondrial permitiram-nos mostrar que tal como no humano, também no modelo animal existe um claro envolvimento da I/R sobre a função mitocondrial com implicação na atividade bioenergética que se traduz por uma menor eficácia na produção de energia. Esse défice de ATP é suficiente para desencadear alterações do metabolismo celular, pelo que podemos considerar que a I/R associada à transplantação hepática interfere no equilíbrio bioenergético celular.

Perante os dados obtidos, e de modo a utilizar metodologias passíveis de reprodução clínica, nos restantes ensaios optámos por aprofundar os estudos utilizando tempos de isquemia de 12 h, período que nos seres humanos é considerado como o tempo máximo permitido para a utilização do fígado para transplante.

O conceito de hipotermia foi introduzido na prática clínica por Bigelow et al. nos inícios de 1950, demonstrando o efeito neuroprotector durante a cirurgia cardíaca [167]. Os benefícios associados à hipotermia incluem a preservação do metabolismo hepático e a redução da resposta inflamatória e da apoptose durante a isquemia [168]. Estudos experimentais recentes demonstraram que a hipotermia leve (32 – 34 °C) exerce um efeito protetor sobre as lesões induzidas pela isquemia quente/reperfusão, embora os mecanismos que induzem proteção hepática não sejam completamente conhecidos [169]. Na prática clínica, Azoulay et al. compararam num grupo de doentes submetidos a cirurgia hepática complexa por tumores hepáticos centrais com envolvimento da veia

cava inferior ou da confluência das veias hepáticas com a veia cava, e comprovaram o efeito protetor da realização de perfusão hepática in situ hipotérmica quando comparado com exclusão vascular total superior a 60 minutos. De acordo com esse estudo, os doentes submetidos a perfusão hipotérmica apresentavam melhor tolerância à lesão induzida pela I/R, que se traduzia numa melhoria das funções hepáticas e renais pós-operatórias e numa menor morbidade [170].

No presente estudo tínhamos como objetivo avaliar em laboratório, o conceito de hipotermia aplicado à reperfusão durante a transplantação hepática. Para tal, definimos uma temperatura de reperfusão de 32 °C, que de acordo com os estudos experimentais, é a temperatura que apresenta um efeito protetor mais eficaz [171, 172].

Nos ensaios realizados, todos os parâmetros de potencial de membrana mitocondrial e de respiração mitocondrial estavam mais preservados no grupo submetido a reperfusão hipotérmica, quando comparados com o grupo da reperfusão normotérmica.

Para além dessas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de potencial de membrana mitocondrial e de respiração mitocondrial, também a quantidade de ATP produzida no tecido hepático no grupo submetido a reperfusão hipotérmica foi superior à da registada na reperfusão normotérmica.

Estes dados permitem afirmar que a eventual aplicação deste conceito de reperfusão hipotérmica ao nível da transplantação hepática, poderá ser benéfica sob o ponto de vista bioenergético, dado que a função mitocondrial se encontra preservada.

Para uma eventual aplicabilidade futura na transplantação hepática, será necessário realizar mais estudos quer do ponto de vista funcional, quer técnicos, de modo a tornar possível a integração do conceito de reperfusão hipotérmica na prática clínica.

Capítulo VI

Estudo experimental do efeito da adição de Berberina à solução de preservação na função mitocondrial e metabolismo energético no modelo animal de transplante hepático

Foram avaliados os eventuais efeitos na função mitocondrial e na atividade bioenergética adicionando berberina à solução de preservação. Procedeu-se à realização de múltiplos ensaios, nos quais foram mantidos os tempos de isquemia fria (12 h) e de reperfusão (1 h). Nestes ensaios, ao grupo A foi adicionado berberina durante a I/R, enquanto que no grupo B foi realizado o mesmo procedimento à exceção da adição deste composto.

Bioenergética mitocondrial: potencial membranal, respiração mitocondrial e quantificação de ATP

Potencial membranal

Para a obtenção dos dados de potencial membranal foi utilizado o Succinato. De acordo com os resultados, identificou-se uma melhoria dos parâmetros de função mitocondrial no grupo A, comparativamente com o grupo B, que foi submetido a I/R sem adição desse composto. A *Lag phase* encontra-se diminuída no grupo A, corroborando os dados de medição dos potenciais, que confere à berberina um efeito protetor do potencial de membrana mitocondrial (Tabela 17).

	Succinato		
	Controlo	Grupo A	Grupo B
Potencial Inicial (-mV)	207,4 ± 5,0	204,5 ± 4,7	176,4 ± 2,3**
Despolarização (-mV)	24,0 ± 1,0	23,5 ± 1,3	16,9 ± 0,8**
Lag phase (s)	54,6 ± 2,8	57,0 ± 1,9	104,4 ± 4,1**
Repolarização (-mV)	194,7 ± 7,7	197,6 ± 6,5	172,6 ± 2,1**

TABELA 17– COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE POTENCIAL MEMBRANA E LAG PHASE ENTRE O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR)

O $\Delta\psi$ e a *Lag phase* foram determinados na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

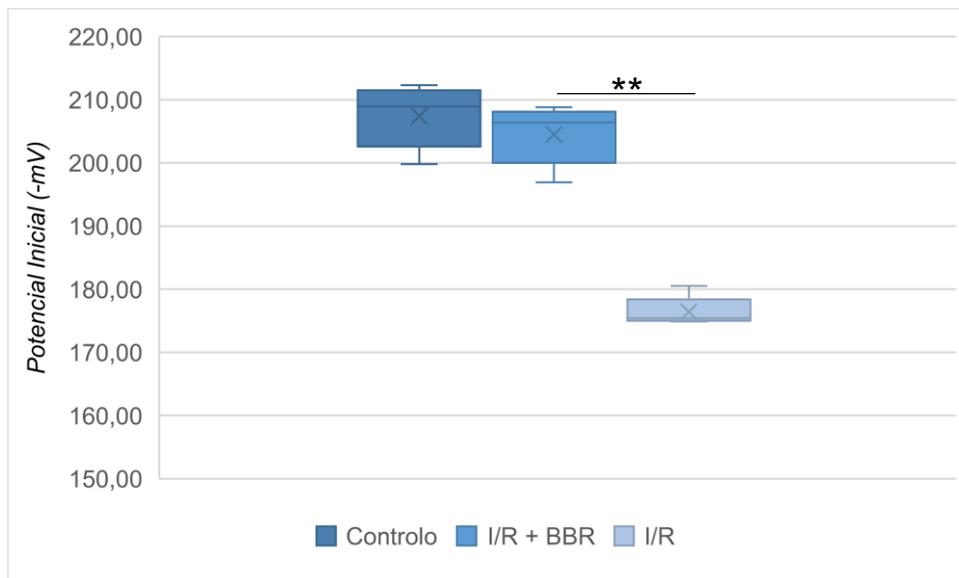


FIGURA 31- GRÁFICO DA MEDICAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA INICIAL ($\Delta\psi$) ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR).

O $\Delta\psi$ foi determinado na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A(BBR) e o grupo B (sem BBR). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

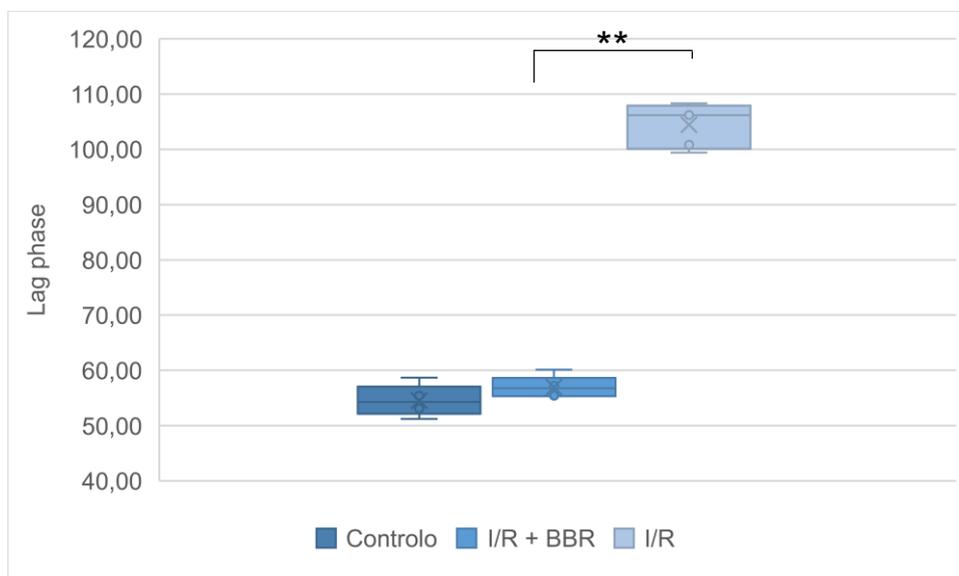


FIGURA 32- GRÁFICO DA MEDICAÇÃO DA LAG PHASE ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR).

A Lag phase foi determinado na presença de Succinato como substrato respiratório. A fosforilação foi induzida pela adição de 100 nmol de ADP. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A (BBR) e o grupo B (sem BBR). Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Respiração mitocondrial

A respiração mitocondrial foi medida avaliando o consumo de oxigênio após energização das mitocôndrias com Succinato. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela seguinte (Tabela 18).

	Succinato		
	Controlo	Grupo A	Grupo B
Estado 3 (nátomos O/ min/mg proteína)	108,4 ± 1,8	102,8 ± 2,5	65,4 ± 1,4**
Estado 4 (nátomos O/ min/mg proteína)	17,8 ± 0,5	17,4 ± 0,6	20,9 ± 0,2**
ICR	6,1 ± 0,2	5,9 ± 0,3	3,1 ± 0,1**
ADP/O	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,48 ± 0,1**
vFCCP (nátomos O/ min/mg proteína)	129,4 ± 4,5	129,4 ± 3,4	122,0 ± 2,5**

TABELA 18- VALORES DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL OBTIDOS ENTRE O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR)

A quantificação da respiração mitocondrial hepática nos grupos A (BBR) e no grupo B (sem BBR), quando estimuladas com Succinato. Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Da análise dos resultados observa-se que no grupo onde se adicionou a berberina, os valores do Estado 3, Estado 4 e ICR encontram-se mantidos quando comparados com o grupo sem adição do composto, e que as diferenças entre os grupos A e B têm significado estatístico ($p < 0,001$). A associação da berberina ao meio, permite preservar a eficiência fosforilativa das mitocôndrias, conferindo um efeito protetor das lesões induzidas pela I/R sobre a atividade mitocondrial (Figura 33 e 34).

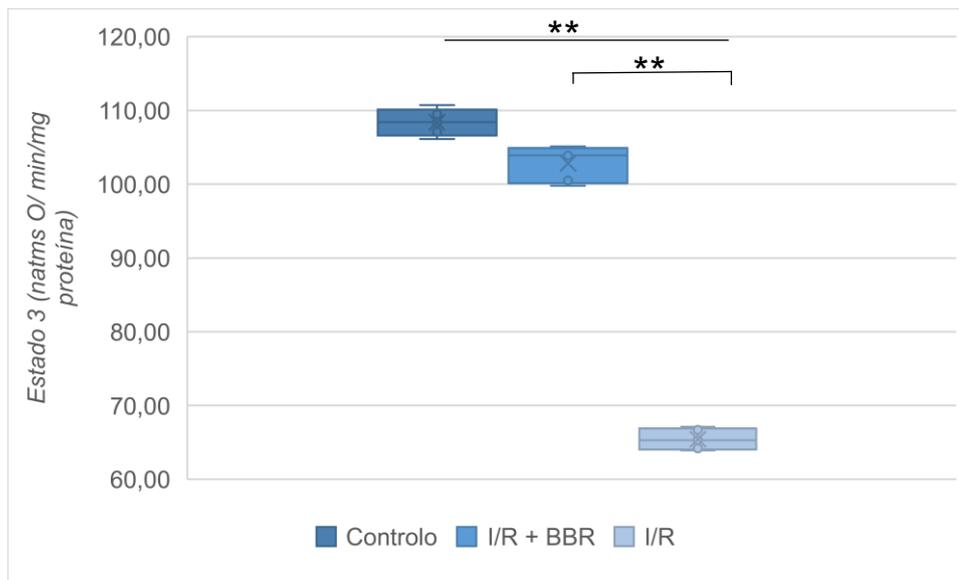


FIGURA 33- REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DE ESTADO 3 RESPIRATÓRIO OBTIDOS ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR).
Determinação do estado 3 respiratório na presença de Succinato como substrato respiratório. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A e o B. Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

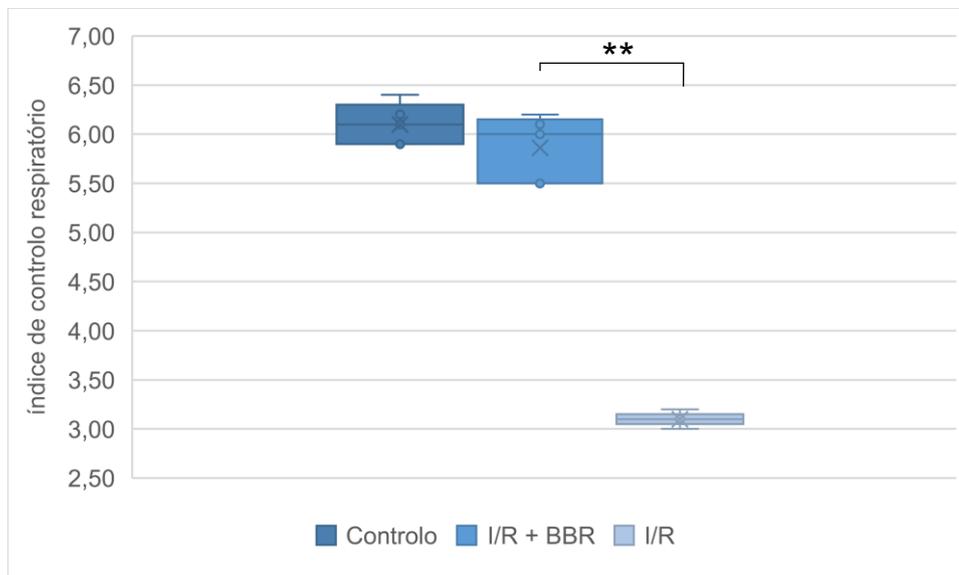


FIGURA 34- REPRESENTAÇÃO DOS ÍNDICE DE CONTROLO RESPIRATÓRIO OBTIDOS ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR).
Determinação do índice de controlo respiratório na presença de Succinato como substrato respiratório. Na comparação das médias determinaram-se diferenças com significado estatístico entre o grupo A e o B. Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Quantificação de ATP

O gráfico seguinte mostra os valores comparativos de ATP determinados no tecido hepático dos animais após a adição da berberina. Estes dados demonstram que a berberina promove a preservação da atividade mitocondrial, que se traduz por uma maior eficiência energética relacionada com a maior conteúdo em ATP (Figura 35).

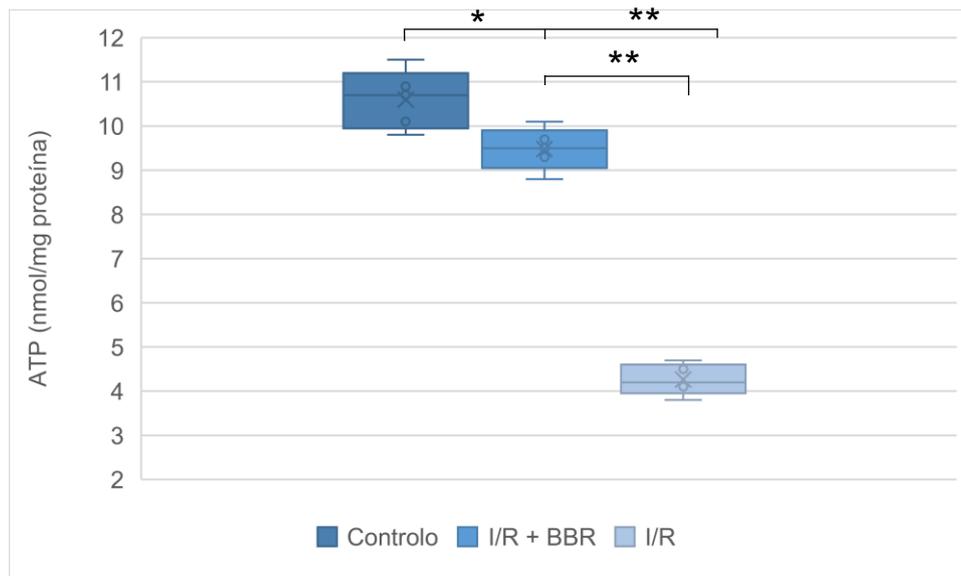


FIGURA 35- GRÁFICO REPRESENTATIVO DOS VALORES DA QUANTIFICAÇÃO DE ATP OBTIDOS ENTRE O GRUPO CONTROLO, O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (SEM BBR).

Quantificação dos valores de ATP presentes no tecido hepático no grupo controlo e nos grupos A (BBR) e B (sem BBR). De referir a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos A e B. Na comparação das médias um $p < 0,05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

Indução da permeabilidade transitória mitocondrial

A capacidade de retenção de cálcio mitocondrial é um componente importante da atividade celular mitocondrial. Após um certo limiar, ocorre um aumento repentino da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, denominada por permeabilidade de transição mitocondrial (MPT), e que permite a passagem de solutos de elevado peso molecular. O seguinte gráfico ilustra os dados recolhidos durante os ensaios sobre a permeabilidade transitória das mitocôndrias, conforme descrito (Figura 36).

Na presença de uma elevada dose de cálcio e ciclosporina A (um inibidor específico de mPTP), não ocorre a intumescência das mitocôndrias, o que é um indicador da integridade das mitocôndrias isoladas. Existe uma relação entre a diminuição mais rápida da absorvência com a pior capacidade de retenção de cálcio mitocondrial. O suplemento de BBR é capaz de prevenir a indução de MPT, indicando uma melhoria da capacidade de retenção de cálcio

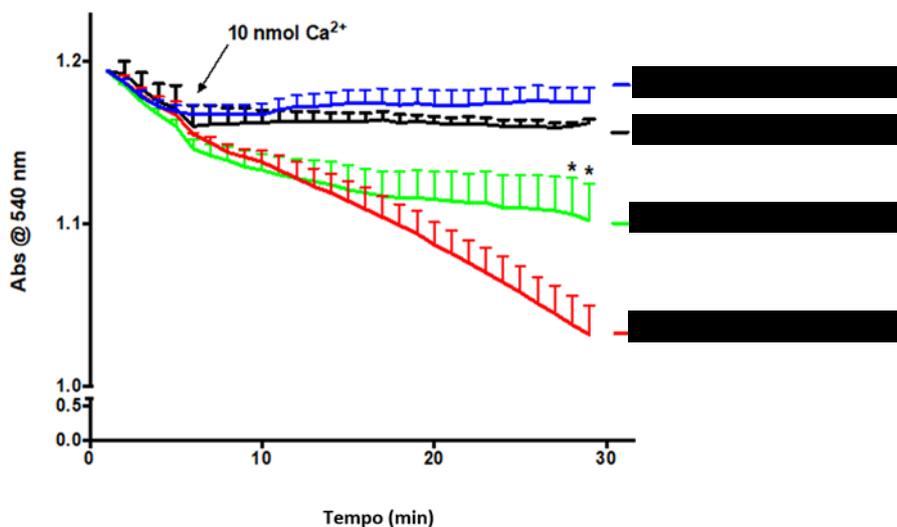


FIGURA 36- INDUÇÃO DA PERMEABILIDADE TRANSITÓRIA MITOCONDRIAL EM MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS DE ANIMAIS OBTIDOS ENTRE O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (I/R SEM BBR). Representação gráfica da indução de permeabilidade transitória mitocondrial (mPTP) ocorre para 10 nmol de Ca^{2+} , avaliado a fluorescência a 540 nm. Os traçados representam a média e o desvio padrão de 4 - 6 animais de acordo com os grupos: A (BBR) e o B (I/R sem BBR). Na comparação das médias um $p < 0.05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo; ** $p < 0,01$.

A análise dos dados demonstra que as mitocôndrias dos animais do grupo B (I/R sem BBR) sofrem uma perda de absorvência muito mais rapidamente do que no grupo A (BBR), o que indica que estas mitocôndrias se encontram mais suscetíveis à indução da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial, ou seja, estão mais fragilizadas e menos funcionais. A adição da Ciclosporina A (inibidor da abertura do mPTP) ao grupo submetido apenas a I/R, confirma esta análise.

Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção de ROS mitocondrial foi avaliada com recurso a uma sonda sensível a H_2O_2 , H_2DCFDA . Apesar de uma tendência para maior produção de ROS no grupo de animais submetidos a I/R (quando comparados com o grupo controlo), o seguinte gráfico mostra o aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias isoladas dos animais no grupo B (I/R sem BBR), em comparação com o nível de ROS das mitocôndrias dos animais do grupo A (BBR) (Figura 37).

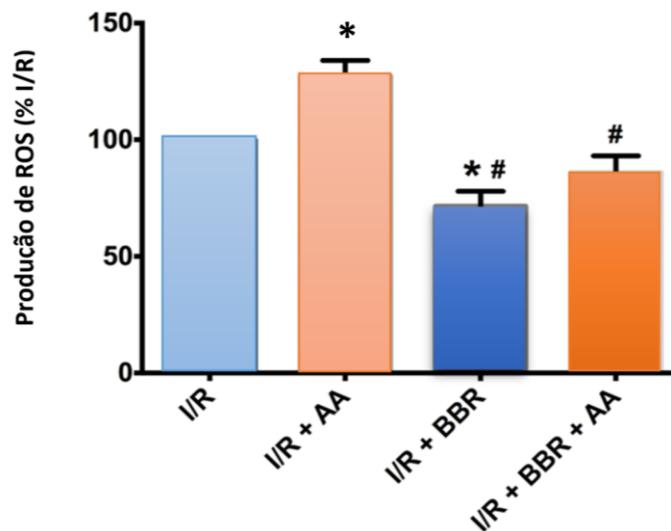


FIGURA 37– REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE H_2O_2 NAS MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS A I/R HEPÁTICA ENTRE O GRUPO A (BBR) E O GRUPO B (I/R SEM BBR) AVALIADO POR FLUORESCÊNCIA DE H_2DCFDA .

Depois de registar a produção basal de H_2O_2 , foi adicionada em ambos os grupos Antamicina A (AA) 1,25 nmol/mg proteína. A elevação da produção de H_2O_2 foi registada como consequência do bloqueio da cadeia respiratória. I/R (grupo B) a produção de ROS encontra-se elevada comparativamente com a adição de BBR (grupo A) e com o grupo controlo (não representado), efeito que é exacerbado pela adição de AA. A suplementação com BBR reduz a produção de ROS para níveis próximos do grupo controlo. O gráfico de barras representa a média e o desvio padrão de 4 animais de acordo com os grupos: A (I/R com BBR) e o B (I/R). Na comparação das médias um $p < 0.05$ (*) foi considerado estatisticamente significativo vs grupo B; na comparação das médias um $p < 0.05$ (#) foi considerado estatisticamente significativo vs grupo B + AA.

Western blot

A quantificação de proteínas nas preparações hepáticas obtidas por Western Blot. A análise da Figura 38 demonstra que a I/R com BBR (grupo A) ocorre um aumento na forma ativa de LC3 (LC3-II), indicando um aumento na autofagia, que se encontra

reduzida nos animais sem BBR (grupo B). Além disso, a I/R sem BBR (grupo B) identifica-se uma redução severa nos níveis das desacetilases dependentes de NAD^+ SirT1 e SirT3, indicando um comprometimento metabólico nestas preparações. O tratamento com BBR restaura os níveis dessas proteínas aproximando-as dos valores identificados no grupo controlo.

Finalmente, em relação à quantificação de PGC-1 α que funciona como co-ativador da transcrição e que desempenha um papel regulador da biogênese mitocondrial, estava quase ausente nas preparações do grupo B, enquanto no grupo A foi restaurado para níveis próximos do grupo controlo. Estes dados demonstram ainda que a I/R foi bastante prejudicial para a homeostase metabólica hepática (com especial relevância para a função mitocondrial), o que foi impedido pela suplementação BBR (Figura 38).

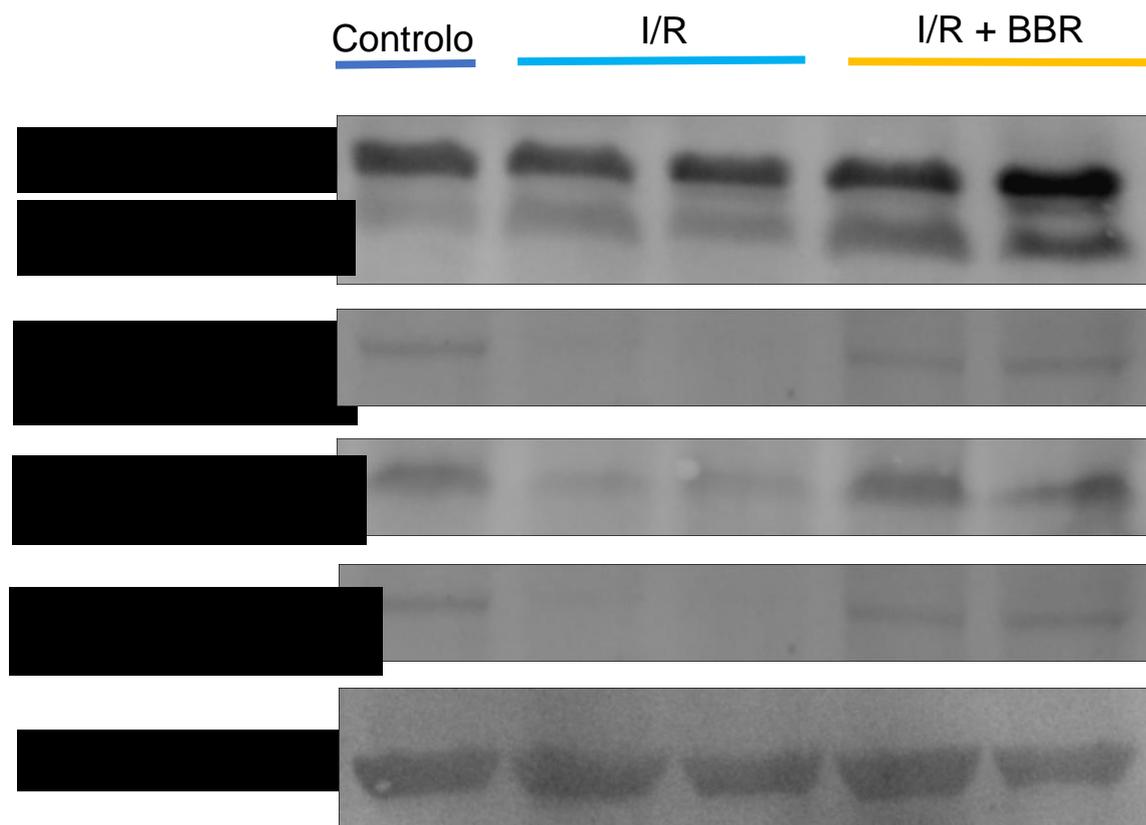


FIGURA 38- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIFICAÇÃO PROTEÍCA (LC3 I E II, SIRT1 E SIRT3, PGC-1A E B-ACTIN) NOS FÍGADOS DOS RATOS DO GRUPO CONTROLO E NOS GRUPOS SUBMETIDOS A I/R NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BBR.

Os fígados I/R apresentaram conteúdo reduzido em SirT1, SirT3 e PGC-1 α , enquanto a forma ativa de LC3 foi reduzida (todos os efeitos foram impedidos pela adição BBR, Grupo A). A imagem de Western Blot representativa dessas experiências para as respectivas proteínas. Os animais de controlo foram operados simultaneamente.

Real time PCR

O estudo de expressão gênica foi realizado por real time PCR, tendo sido avaliados vários genes envolvidos no metabolismo mitocondrial e celular. De acordo com a Figura 39, após a adição de BBR identificou-se um aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo celular (SirT1) e no metabolismo mitocondrial (PGC-1 α , COX IV). Curiosamente, não foram encontradas alterações da expressão gênica de SirT3, MnSOD2 ou NDUFS8 (Figura 39).

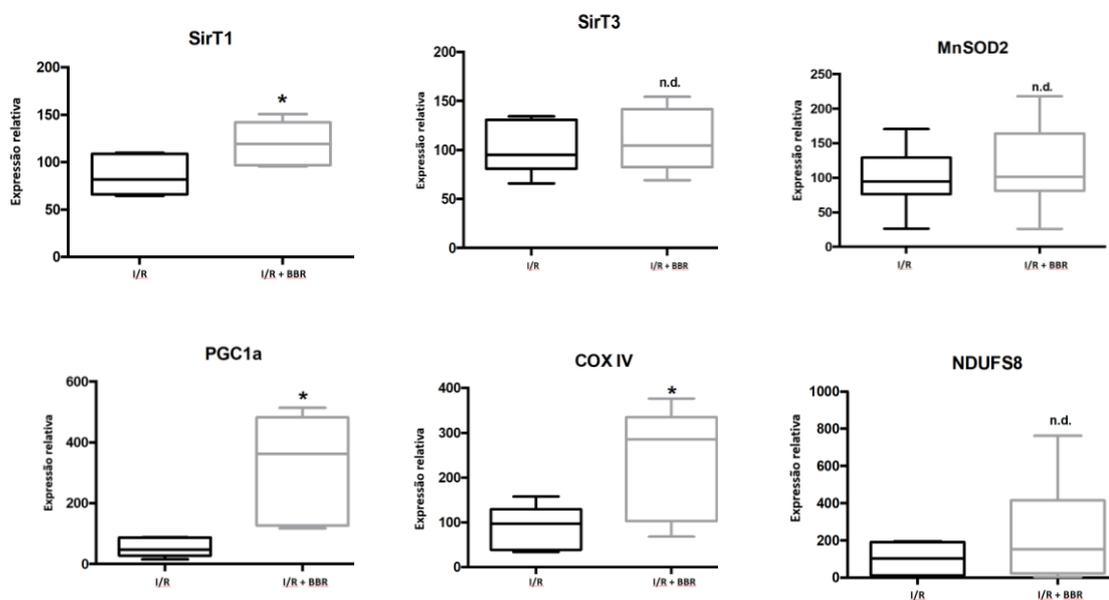


FIGURA 39- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EXPRESSÃO GENÉTICA (SIRT1 E SIRT3, PGC-1A, MNSOD2, COX IV E NDUFS8) NOS FÍGADOS DOS RATOS SUBMETIDOS A I/R NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BBR.

Nos fígados submetidos a I / R com BBR, houve um aumento da expressão gênica de SirT1, COX IV e PGC-1 α quando comparados com o grupo sem BBR. Não foram encontradas diferenças na expressão gênica de SirT3, de MnSOD2 e de NDUFS8.

(*) indica uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) relativamente ao grupo controle; n.d., representa ausência de diferença.

Avaliação histológica

Microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão

Apresentamos o resultado da avaliação histológica após realização de I/R se e com a adição da berberina. Pudemos verificar que contrariamente ao que se observa nos grupos de controlo e no grupo I/R com berberina, no grupo submetido a I/R sem adição de berberina os hepatócitos adquirem uma aparência mais arredonda, associando-se uma descoesão moderada a marcada dos hepatócitos. Apesar destas alterações a ultraestrutura mitocondrial mantém-se íntegra em todos os grupos (Figura 40 a 43).

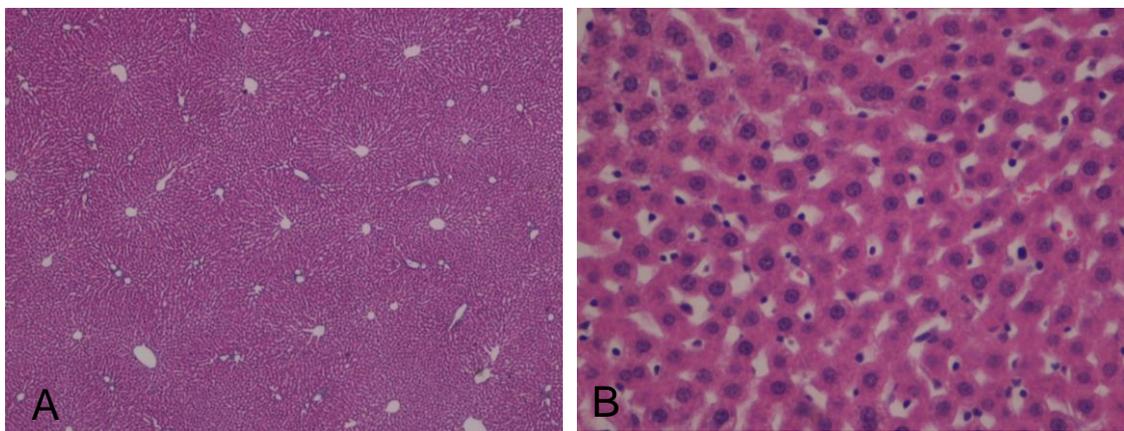


FIGURA 40- BIÓPSIA HEPÁTICA. I/R COM ADIÇÃO DE BERBERINA

Tecido hepático manutenção da arquitetura habitual, sem esteatose, infiltrado inflamatório nem fibrose. Ligeira dilatação sinusoidal pericentrolobular. Hepatócitos com preservação do núcleo e dos organelos intracelulares, sem necrose nem apoptose (A- H&E, ampliação de 40x; B- H&E, ampliação de 400x).

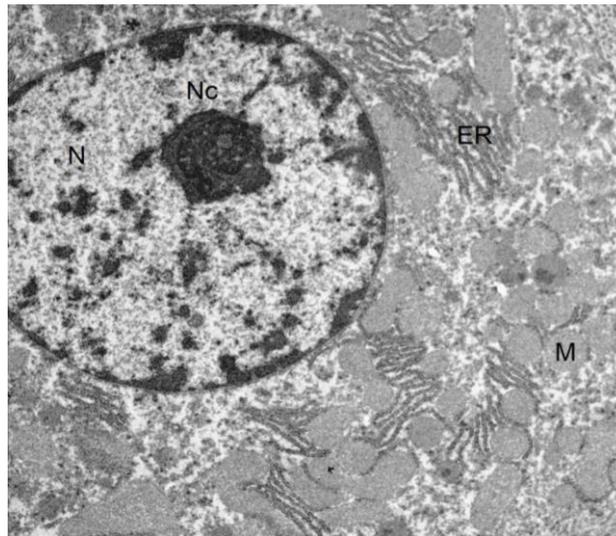


FIGURA 41- I/R COM ADIÇÃO DE BERBERINA. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO HEPÁTICO DE RATO.

Características ultraestruturais de parênquima hepático de rato após a adição da berberina. Presença de hepatócitos normais, que se encontram adjacentes e lineares. As mitocôndrias são homogêneas quer na dimensão quer na sua estrutura; N, núcleo; Nc, nucléolo; M, mitocôndria; ER, retículo endoplasmático.

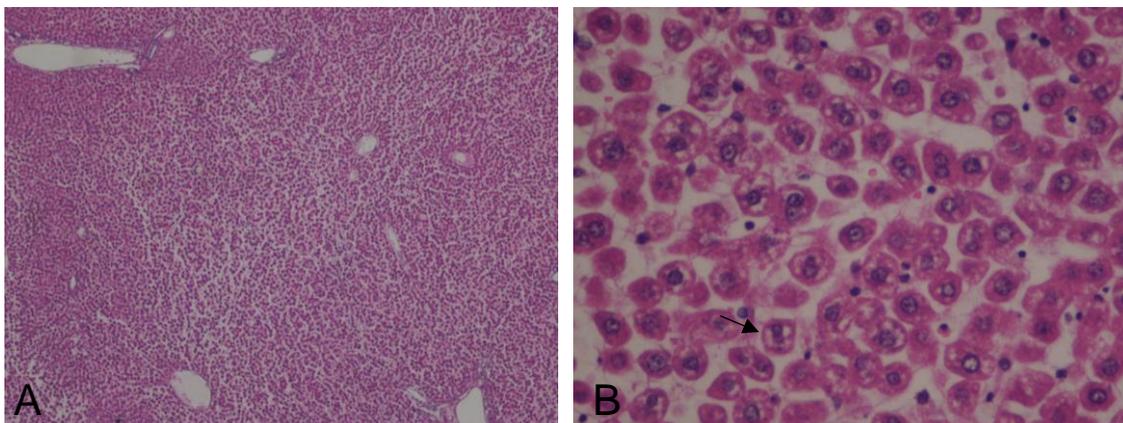


FIGURA 42- BIÓPSIA HEPÁTICA. I/R SEM ADIÇÃO DE BERBERINA.

Parênquima hepático com arquitetura preservada com espaços porta sem lesões dos seus constituintes. Observa-se descoesão moderada a marcada dos hepatócitos, por vezes arredondados e com discreta balonização, focalmente com corpos de Mallory-Denk (seta), com preservação do núcleo e dos organelos. Não se identificou necrose nem apoptose. (A- H&E, ampliação de 40x; B- H&E, ampliação de 400x).

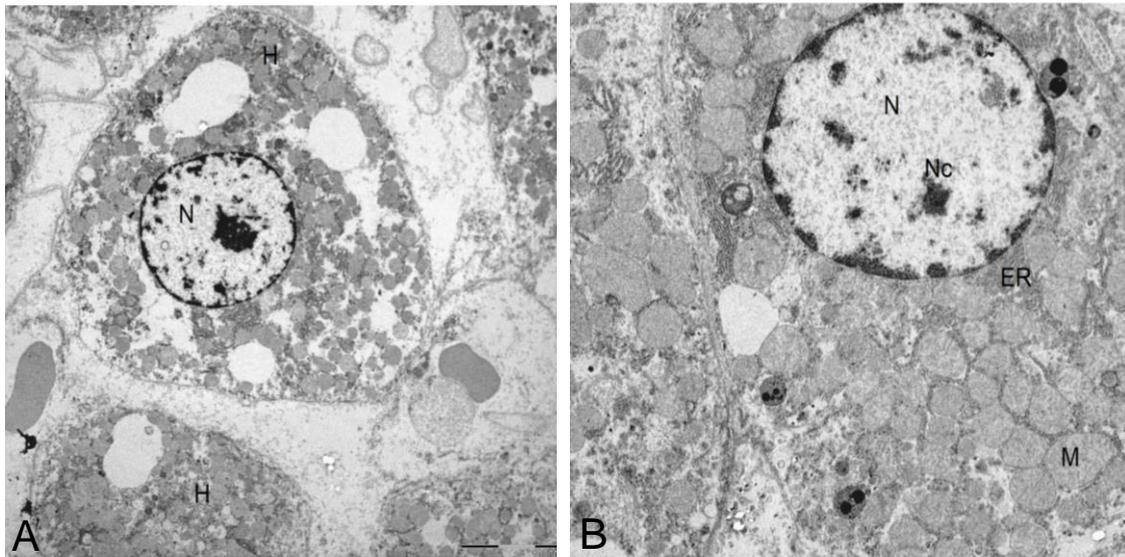


FIGURA 43- I/R SEM ADIÇÃO DE BERBERINA. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO DE TECIDO HEPÁTICO DE RATO.

Características ultraestruturais de parênquima hepático de rato após I/R sem adição da berberina. A) presença de descoesão moderada a marcada dos hepatócitos. Hepatócitos adotam uma aparência mais arredondada, mas com contornos regulares. B) as mitocôndrias são homogêneas e mantêm integridade da sua ultraestrutura. H, hepatócitos; N, núcleo; Nc, nucléolo; M, mitocôndria; ER, retículo endoplasmático.

Discussão

De modo a diminuir o dano celular induzido pela I/R na cirurgia hepática e em particular na transplantação hepática, têm sido desenvolvidos múltiplos estudos experimentais, nos quais foram utilizadas estratégias de pré-condicionamento isquémico, sendo de salientar a utilização de múltiplas estratégias farmacológicas.

Apesar deste esforço, a translação destas estratégias para a prática clínica tem sido muito reduzida, provavelmente porque muitos destes estudos experimentais utilizaram metodologias não passíveis de reprodução clínica.

A berberina é um composto largamente conhecido da medicina Chinesa e é um alcalóide de isoquinolina presente em várias espécies (por exemplo, incluindo *Coptis* sp. e *Berberis* sp., entre outros) [173]. A BBR é geralmente utilizado para o tratamento de várias doenças, como complicações intestinais e infeções [173, 174]. Vários estudos confirmaram que a BBR aumenta a atividade enzimática antioxidante, a captação de glicose e ao mesmo tempo reduz a peroxidação lipídica [175, 176].

O efeito da adição da BBR na lesão hepática após transplante hepático não está bem definido. Alguns estudos parecem mostrar que a BBR está implicada na melhoria da lesão hepática induzida pela I/R na transplantação hepática por redução dos níveis de *stress* oxidativo e da taxa de apoptose que estão envolvidos na inativação do mTOR [177].

Neste capítulo pretendemos demonstrar experimentalmente utilizando uma metodologia com potencial translacional, o efeito protetor da BBR na função mitocondrial e na atividade bioenergética, contra a lesão hepática provocada pela I/R no contexto da transplantação hepática.

Na avaliação dos ensaios da função mitocondrial observou-se uma preservação dos parâmetros de potencial de membrana comparativamente com o grupo controlo. De notar que, no grupo de I/R sem adição de BBR, estes parâmetros de potencial de membrana estão diminuídos, e verificando-se que esta diferença tem significado estatístico ($p < 0,001$).

Confirmando-se os resultados obtidos, a Lag phase encontra-se aumentada sem BBR, pelo que a adição deste composto promove uma melhoria da função mitocondrial.

A análise dos valores da atividade respiratória mitocondrial mostra que comparativamente com o grupo controlo, o consumo de O_2 nos grupos estudados é

inferior, facto que está relacionado com o efeito da I/R sobre a atividade mitocondrial. Da comparação entre os grupos, com ou sem BBR, observou-se que no grupo da BBR, o consumo de O₂ é superior, confirmando por este método, que as mitocôndrias estão mais funcionais, inferindo-se deste modo que a BBR confere um efeito proteção contra o dano mitocondrial induzido pela I/R.

Relativamente à quantificação média de ATP, verificou-se que comparativamente com o grupo controlo, a variação percentual de produção de energia entre os grupos com ou sem BBR é de 50%.

Os dados da indução da permeabilidade transitória mitocondrial mostram que a BBR confere uma menor indução da abertura do poro da membrana mitocondrial, que se traduz por uma menor perda de absorvência, quando comparado com o grupo sem BBR. Por este facto, pode considerar-se que a BBR exerce um efeito protetor sobre a atividade funcional da mitocôndria.

Relativamente à produção de ROS, verificou-se neste estudo, uma redução da quantidade de ROS produzida, no grupo em que foi adicionada a BBR. Perante estes dados podemos depreender que a BBR exerce um efeito antioxidante, conferindo proteção contra a lesão I/R.

Foi reportado que a utilização da BBR está implicada em alterações da expressão genética, mais especificamente em genes que codificam enzimas reguladores da atividade metabólica. Para completar nossa avaliação dos efeitos da BBR sobre a função mitocondrial hepática, foi avaliada a expressão genética e a quantificação do conteúdo proteico por meio de qPCR e Western Blot, respectivamente.

A Sirt1 regula a expressão genética e a atividade proteica de diversos processos celulares, sendo de destacar a proliferação celular, o metabolismo celular, a reparação do DNA, resposta perante o *stress* e à sobrevivência celular [178, 179]. A Sirt1 interfere na regulação da biogénese mitocondrial e na mitofagia, contribuindo para a manutenção da qualidade das mitocôndrias presentes na célula. Esses estímulos podem variar de acordo com os défices energéticos relacionados com doenças ou agressões [180].

Os nossos dados indicam que a expressão de genes e o conteúdo protéico de SirT1, após a suplementação com BBR, foram mantidos em níveis sobreponíveis aos do grupo controlo. Como tal, parece que a BBR pode atuar através da indução dos níveis e atividade da SirT1.

Em estudos prévios descrevemos o papel da BBR sobre a SirT3 (o equivalente mitocondrial do SirT1 citosólico e nuclear) num ambiente de elevado teor de gordura alimentar, pelo que esperávamos encontrar mecanismos semelhantes. Curiosamente, não encontramos alterações na expressão genética de SirT3, apesar de um efeito robusto sobre os níveis de proteína.

A SirT3 é uma desacetilase mitocondrial que tem um papel primordial na homeostase metabólica e na regulação redox. A ausência de SirT3 conduz à hiperacetilação das proteínas mitocondriais, nomeadamente do Complexo I e II, e de enzimas envolvidas na β -oxidação lipídica mitocondrial conduzindo à concomitante diminuição da sua eficiência, facto que é facilmente comprovado pela diminuição dos níveis de ATP produzidos [181-184].

Até ao momento não existe uma resposta definitiva sobre o papel da BBR na atividade das sirtuínas, e, como tal, continua sendo uma fascinante área de investigação para futuros trabalhos.

A expressão genética e os níveis de proteína de PGC-1 α foram avaliados. Este regulador da função mitocondrial e da biogénese tem sido amplamente relacionado com o aumento da atividade mitocondrial, com aumento do número de cópias de mtDNA e também com a presença de uma maior massa mitocondrial [185]. Os resultados deste estudo mostram que a BBR contribui para a melhoria da função mitocondrial, como resultado do incremento do número de unidades mitocondriais resultantes da modulação dos níveis de PGC-1 α , contribuindo para uma melhoria da capacidade respiratória mitocondrial e dos níveis de ATP. Estes dados também são corroborados pela elevação da expressão genética de COX IV [186].

Embora não tenham sido encontradas alterações nos níveis de expressão genética de NDUSF8 quer de outras subunidades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (dados não mostrados), não é possível excluir a interferência na biogénese mitocondrial, dado que os processos de transcrição/replicação de mtDNA e biogénese mitocondrial são complexos e demorados, pelo que o tempo definido para o estudo experimental (12 h) pode não ter sido suficiente para permitir identificar essas diferenças.

Um claro indicador da preservação da função celular e mitocondrial induzida pela BBR em condições de I/R, são os níveis de proteína LC3 (LC3-II) ativa que se encontram aumentados na relação LC3-II/LC3-I [187]. LC3 é um marcador de autofagia, cuja

ativação leva à degradação de vários componentes celulares como uma tentativa final desesperada pela célula de manter os níveis de ATP [188, 189].

Para além da realização de ensaios da função mitocondrial e da bioenergia mitocondrial, foi avaliado o papel da BBR no parênquima hepático e ao nível do hepatócito. No grupo controlo e no grupo I/R com BBR, as alterações no parênquima do hepático e nos hepatócitos são mínimas. Nestes grupos a arquitetura do fígado é normal, não se observando sinais de esteatose, fibrose ou infiltrado inflamatório. Os hepatócitos mantêm as suas características ultraestruturais preservadas. Contrariamente, no grupo submetido a I/R sem adição de BBR observamos uma desassociação moderada a grave dos hepatócitos, estes adotam uma forma mais arredondada, embora os organelos intracelulares mantenham as suas estruturas preservadas. Em toda a avaliação histológica, não houve sinais de apoptose ou necrose.

A avaliação histológica do parênquima hepático mostra que a BBR contribui para a manutenção da normal arquitetura do parênquima hepático e preservação da estrutura celular do hepatócito, diminuindo o impacto celular induzido pela I/R.

Os resultados dos estudos funcionais e estruturais permitem demonstrar que a BBR poderá ter um elevado potencial na redução da lesão induzida pela I/R no âmbito da transplantação hepática. No entanto, serão necessários mais estudos de modo a confirmar a eficácia e o real valor da adição deste composto.

Parte IV

DISCUSSÃO GERAL

A transplantação hepática é a única opção terapêutica, com caráter definitivo, em doentes com falência hepática aguda ou crónica, como consequência de patologias do foro benigno ou maligno [190]. A principal limitação desta opção terapêutica, está relacionada com a falta de disponibilidade de órgãos, o que condicionou o desenvolvimento de sistema de alocação de órgãos [191]. De modo a aumentar a disponibilidade de órgãos, houve necessidade de incluir órgãos subótimos provenientes dadores com idades superiores a 80 anos, dadores após paragem cardíaca, com tempos de isquemia fria prolongados ou fígados com esteatose macrovesicular [192-194].

O processo de I/R relacionado com a transplantação hepática, é um processo multifatorial que pode condicionador o sucesso do órgão implantado [195]. Ao nível do hepatócito, um dos organelos mais afetados é a mitocôndria. Esta disfunção mitocondrial é responsável pela diminuição da produção energética, pelo incremento da produção de ROS, para além de estar implicada nos processos de apoptose e necrose celular [196].

Durante os últimos anos, foram desenvolvidos múltiplos estudos experimentais numa tentativa de avaliação do impacto do processo de I/R na disfunção mitocondrial hepática.

Neste estudo pretendeu-se demonstrar pela primeira vez no ser humano a influência da I/R sobre a mitocôndria, estudando a função mitocondrial e a atividade bioenergética, em amostras de tecido hepático vivo provenientes de fígados humanos utilizados na transplantação hepática. Para tal, foi necessário realizar ensaios laboratoriais imediatamente após a colheita das biópsias, facto que implicou a disponibilidade total da equipa, dado o caráter de urgência inerente à transplantação hepática.

Foram analisados vários parâmetros da função mitocondrial e da atividade bioenergética. Da comparação entre as amostras identificou-se uma diferença estatisticamente significativa para todos os parâmetros estudados ($p < 0,001$).

Neste estudo verificou-se que as variações dos tempos de isquemia fria ou quente, não estão correlacionadas com as variações observadas nos parâmetros da atividade mitocondrial. Este facto pode ser explicado por se verificar uma pequena variação nos tempos de isquemia fria e também pelo facto da segunda biópsia ser colhida uma hora após a reperfusão, o que provavelmente não será suficiente para correlacionar os tempos de I/R com as alterações identificadas nos parâmetros de função mitocondrial.

As condições inerentes ao transplante hepático, impedem a realização de uma biópsia em cunha, umas horas ou dias após transplante, facto que seria cientificamente relevante pois permitiria identificar quando é que se verifica o restabelecimento da função mitocondrial.

Dos resultados obtidos na correlação entre as variações bioenergéticas e a função mitocondrial com os biomarcadores clínicos, podemos inferir fatores preditivos precoces no pós-operatórios do transplante hepático. Dos biomarcadores clínicos estudados, verificou-se uma correlação entre: a TGO, a bilirrubina direta e o lactato arterial com as variações da função mitocondrial e da atividade bioenergética ($p < 0,01$).

Quando analisados os resultados clínicos, e apesar da baixa taxa de complicações registadas, verificou-se uma correlação entre as complicações tardias e as variações do estado 3 respiratório.

Os dados obtidos permitem demonstrar pela primeira vez em tecido hepático vivo proveniente de fígados humanos utilizados na transplantação hepática, uma relação direta entre a função mitocondrial e a I/R. A utilização futura destes marcadores clínicos como fatores de prognósticos da atividade mitocondrial, pode permitir a identificação precoce de falência hepática pós-transplante e antecipar a necessidade de realizar um novo transplante.

Da avaliação da função mitocondrial e do metabolismo energético associado aos diferentes padrões de lesão hepática induzidos pela isquemia/reperfusão nos fígados humanos, podemos afirmar que os eventos identificados sobre a atividade mitocondrial são sobreponíveis aos observados nos fígados no modelo animal.

No modelo animal para além de identificar o efeito da I/R sobre a atividade mitocondrial, também foi possível demonstrar que as variações nos tempos de isquemia fria, não foi um factor determinante para o agravamento da disfunção mitocondrial.

No sentido de diminuir o impacto da I/R sobre a função mitocondrial, foram realizados múltiplos estudos experimentais, com o intuito de desenvolver estratégias que permitissem mitigar esse efeito.

Na cirurgia hepática, o conceito de perfusão hepática hipotérmica tem vindo a ser desenvolvido ao longo dos tempos. A sua aplicação clínica apesar de limitada, tem vindo a ser descrita em cirurgias hepáticas complexas onde existe necessidade de realizar uma exclusão vascular total associando-se perfusão hipotérmica in situ [197].

Com base nestes trabalhos, pretendeu-se aplicar este conceito à transplantação hepática e avaliar a influência da reperfusão hipotérmica como estratégia protetora da atividade mitocondrial. A reperfusão hipotérmica permitiu diminuir o efeito da I/R sobre a atividade mitocondrial, promovendo uma maior disponibilidade bioenergética (42 %) quando comparado com a reperfusão normotérmica.

A reperfusão hipotérmica deverá ser tida em conta no futuro da transplantação hepática, dado o caráter protetor hepático conferido pela preservação da função mitocondrial e do balanço energético hepático. Apesar destes resultados, será necessário desenvolver mais estudos para validar a utilização deste mecanismo de proteção na prática clínica.

Foram desenvolvidas várias estratégias farmacológicas de modo a preservar a viabilidade do órgão e promover a regeneração hepática [198-203]. Infelizmente, poucas compostos foram utilizados na prática clínica, facto provavelmente relacionado com a impossibilidade de transpor as metodologias utilizadas para a aplicabilidade clínica [148]. Dai a importância de se realizar estudos com caráter translacional, aproximando os estudos experimentais aos eventos clínicos.

No presente estudo avaliou-se o papel da BBR como fator protetor da função mitocondrial e da bioenergética no âmbito da transplantação hepática. Para tal, utilizou-se uma metodologia com potencial translacional, pelo que se procedeu à adição deste composto à solução de preservação utilizada durante o transplante hepático humano.

Os resultados mostram uma melhoria dos parâmetros da função mitocondrial (potencial de membrana, respiração mitocondrial, indução da permeabilidade mitocondrial), bem como um incremento de 50 % na quantidade de ATP produzida comparativamente com a I/R sem a adição da BBR. A BBR confere uma melhoria na capacidade de acumulação de Ca^{2+} e uma melhoria da fosforilação oxidativa.

Os estudos de expressão genética permitem verificar um aumento da atividade de SirT1, PGC-1 α e COXIV que codificam enzimas reguladoras da atividade metabólica [204-207]. A regulação da dinâmica mitocondrial, isto é, de processos de biogénese mitocondrial e de mitofagia, permitem por um lado aumentar o número de mitocôndrias na célula de modo a fazer face a um aumento das necessidades energéticas e por outro lado eliminar as mitocôndrias lesadas contribuindo para a manutenção da qualidade das mitocôndrias presentes na célula.

O efeito protetor da adição da BBR verifica-se ao nível da função mitocondrial, mas também ao nível da estrutura celular do parênquima hepático, e em particular dos hepatócitos.

Deste trabalho, novas questões se levantam que poderão ser alvo de futuras investigações. Em primeiro lugar, no estudo clínico seria interessante perceber qual o mecanismo exato que leva à recuperação da normal atividade mitocondrial numa fase tardia após reperfusão. Eventualmente no futuro, com o desenvolvimento tecnológico, torne possível, o isolamento de mitocôndrias a partir de pequenos fragmentos de tecido.

A elevada implicação da disfunção mitocondrial na transplantação hepática leva a pensar que a disfunção hepática primária esteja intimamente relacionada com estes parâmetros. Embora no estudo clínico, não tenha sido possível estabelecer essa correlação, circunstância provavelmente relacionada com o facto de que na série estudada só ter ocorrido um caso de falência hepática primária. A realização de estudos multicêntricos poderia contribuir para a responder a essa questão.

Relativamente aos fatores de proteção estudados, os dados obtidos da reperfusão hipotérmica são relevantes quer do ponto de vista bioenergético, quer da preservação da função mitocondrial. Não obstante os resultados, a futura aplicabilidade clínica é discutível pelo que seria necessário realizar mais estudos envolvendo aspetos técnicos e metabólicos. O efeito protetor da adição da BBR à solução de preservação mostrou um efeito protetor sobre a atividade mitocondrial. Em futuros trabalhos, tendo em vista a sua futura aplicabilidade, será necessário estudar o efeito das variações das concentrações da BBR, em linhas celulares provenientes de biópsias humanas, de modo a determinar os efeitos quer ao nível da função mitocondrial quer ao nível da estrutura celular.

Neste estudo foi utilizado o Celsior como solução de preservação hepática, dado ser a solução utilizada na prática clínica em Portugal. Neste sentido, será necessário perceber se o efeito de proteção mitocondrial e do equilíbrio bioenergético conferido pela adição de BBR ao Celsior, se verifica quando adicionado a outras soluções de preservação.

Esta tese de doutoramento pretendeu dar um contributo significativo para o esclarecimento do papel da disfunção mitocondrial na transplantação hepática humana dado ter sido o primeiro estudo a confirmar essa relação em tecidos hepáticos vivos, permitindo identificar fatores de prognóstico precoces da disfunção mitocondrial. A identificação de eventuais estratégias protetoras que levem à redução do dano

mitocondrial resultante da I/R, podem contribuir para uma melhoria da disponibilidade bioenergética e das funções desempenhadas pela mitocôndria, que poderá conduzir a uma melhoria dos resultados clínicos.

Coimbra, Janeiro de 2018

BIBLIOGRAFIA

1. Agopian, V.G., et al., *The evolution of liver transplantation during 3 decades: analysis of 5347 consecutive liver transplants at a single center*. *Ann Surg*, 2013. **258**(3): p. 409-21.
2. Adam, R., et al., *Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR)*. *J Hepatol*, 2012. **57**(3): p. 675-88.
3. Zarrinpar, A. and R.W. Busuttil, *Liver transplantation: past, present and future*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(7): p. 434-40.
4. Meirelles Junior, R.F., et al., *Liver transplantation: history, outcomes and perspectives*. Einstein (Sao Paulo), 2015. **13**(1): p. 149-52.
5. Fortner, J.G., et al., *Orthotopic and heterotopic liver homografts in man*. *Ann Surg*, 1970. **172**(1): p. 23-32.
6. McDiarmid, S.V., *Liver transplantation. The pediatric challenge*. *Clin Liver Dis*, 2000. **4**(4): p. 879-927.
7. Lancaster, E.M., J.R. Hiatt, and A. Zarrinpar, *Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(2): p. 193-9.
8. Schrem, H., et al., *Update on liver transplantation using cyclosporine*. *Transplant Proc*, 2004. **36**(9): p. 2525-31.
9. Everson, G.T., et al., *Immunosuppression in liver transplantation*. *Minerva Chir*, 2003. **58**(5): p. 725-40.
10. United Network for Organ Sharing. 2012. [cited 2017; Available from: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/annual-report/>].
11. Lucidi, V., et al., *Liver transplantation in the context of organ shortage: toward extension and restriction of indications considering recent clinical data and ethical framework*. *Curr Opin Crit Care*, 2015. **21**(2): p. 163-70.
12. Moris, D., et al., *Liver transplantation for unresectable colorectal liver metastases: A systematic review*. *J Surg Oncol*, 2017. **116**(3): p. 288-297.
13. Dueland, S., et al., *Is Liver Transplantation an Option in Colorectal Cancer Patients with Nonresectable Liver Metastases and Progression on All Lines of Standard Chemotherapy?* *Ann Surg Oncol*, 2015. **22**(7): p. 2195-200.
14. Ringe, B., et al., *The role of liver transplantation in hepatobiliary malignancy. A retrospective analysis of 95 patients with particular regard to tumor stage and recurrence*. *Ann Surg*, 1989. **209**(1): p. 88-98.
15. Iwatsuki, S., et al., *Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report*. *Transplant Proc*, 1988. **20**(1 Suppl 1): p. 498-504.
16. Wall, W.J., *Liver transplantation: current concepts*. *CMAJ*, 1988. **139**(1): p. 21-8.
17. Hibi, T., et al., *Liver transplantation for hepatobiliary malignancies: a new era of "Transplant Oncology" has begun*. *Surg Today*, 2017. **47**(4): p. 403-415.
18. O'Mahony, C.A. and J.A. Goss, *The future of liver transplantation*. *Tex Heart Inst J*, 2012. **39**(6): p. 874-5.
19. Koffron, A. and J.A. Stein, *Liver transplantation: indications, pretransplant evaluation, surgery, and posttransplant complications*. *Med Clin North Am*, 2008. **92**(4): p. 861-88, ix.
20. Grossman, E.J. and J.M. Millis, *Liver transplantation for non-hepatocellular carcinoma malignancy: Indications, limitations, and analysis of the current literature*. *Liver Transpl*, 2010. **16**(8): p. 930-42.
21. O'Leary, J.G., R. Lepe, and G.L. Davis, *Indications for liver transplantation*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(6): p. 1764-76.
22. U.S. Department of Health and Human Services (HHS). *SRTR & OPTN Annual Data Report. 2012* [cited 2017; Available from: https://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2012/Default.aspx].

23. Varma, V., et al., *Indications and contraindications for liver transplantation*. Int J Hepatol, 2011. **2011**: p. 121862.
24. Taniguchi, M., *Liver transplantation in the MELD era--analysis of the OPTN/UNOS registry*. Clin Transpl, 2012: p. 41-65.
25. Flores, A. and S.K. Asrani, *The donor risk index: A decade of experience*. Liver Transpl, 2017. **23**(9): p. 1216-1225.
26. Klein, K.B., T.D. Stafinski, and D. Menon, *Predicting survival after liver transplantation based on pre-transplant MELD score: a systematic review of the literature*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e80661.
27. Machicao, V.I., *Model for End-Stage Liver Disease-Sodium Score: The Evolution in the Prioritization of Liver Transplantation*. Clin Liver Dis, 2017. **21**(2): p. 275-287.
28. Barshes, N.R., et al., *The pediatric end-stage liver disease (PELD) model as a predictor of survival benefit and posttransplant survival in pediatric liver transplant recipients*. Liver Transpl, 2006. **12**(3): p. 475-80.
29. Freeman, R.B., Jr., et al., *The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy*. Liver Transpl, 2002. **8**(9): p. 851-8.
30. Bourdeaux, C., et al., *PELD score and posttransplant outcome in pediatric liver transplantation: a retrospective study of 100 recipients*. Transplantation, 2005. **79**(9): p. 1273-6.
31. Asrani, S.K. and P.S. Kamath, *Model for end-stage liver disease score and MELD exceptions: 15 years later*. Hepatol Int, 2015. **9**(3): p. 346-54.
32. Francoz, C., et al., *Model for end-stage liver disease exceptions in the context of the French model for end-stage liver disease score-based liver allocation system*. Liver Transpl, 2011. **17**(10): p. 1137-51.
33. Llado, L., J. Bustamante, and i.u.e. en nombre del grupo de trabajo de la Sociedad Espanola de Trasplante Hepatico. Electronic address, *[IV Consensus Meeting of the Spanish Society of Liver Transplantation 2012. Exceptions to model for end-stage liver disease in prioritizing liver transplantation]*. Gastroenterol Hepatol, 2014. **37**(2): p. 83-91.
34. Zavaglia, C., et al., *Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(12): p. 2708-16.
35. Mehta, N., et al., *Excellent Outcomes of Liver Transplantation Following Down Staging of Hepatocellular Carcinoma to Within Milan Criteria-a Multi-Center Study*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2017.
36. Llovet, J.M., C. Bru, and J. Bruix, *Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification*. Semin Liver Dis, 1999. **19**(3): p. 329-38.
37. Ijtsma, A.J., et al., *The clinical relevance of the anhepatic phase during liver transplantation*. Liver Transpl, 2009. **15**(9): p. 1050-5.
38. Salizzoni, M., et al., *Piggyback techniques versus classical technique in orthotopic liver transplantation: a review of 75 cases*. Transplant Proc, 1994. **26**(6): p. 3552-3.
39. Meunier, B., et al., *["Piggyback" method in hepatic transplantation]*. Chirurgie, 1993. **119**(10): p. 682-5.
40. Ming, Y.Z., et al., *Hepatic veins anatomy and piggy-back liver transplantation*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012. **11**(4): p. 429-33.
41. Hashimoto, K., et al., *Split liver transplantation in adults*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(33): p. 7500-6.
42. Lauterio, A., et al., *Current status and perspectives in split liver transplantation*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(39): p. 11003-15.
43. Wu, J.F., et al., *Early lactate clearance as a reliable predictor of initial poor graft function after orthotopic liver transplantation*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011. **10**(6): p. 587-92.

44. Reddy, M.S., R. Rajalingam, and M. Rela, *Liver transplantation in acute-on-chronic liver failure: lessons learnt from acute liver failure setting*. *Hepatol Int*, 2015. **9**(4): p. 508-13.
45. Cavallari, A., et al., *Treatment of vascular complications following liver transplantation: multidisciplinary approach*. *Hepatogastroenterology*, 2001. **48**(37): p. 179-83.
46. Yilmaz, A., et al., *Vascular complications in living-related and deceased donation pediatric liver transplantation: single center's experience from Turkey*. *Pediatr Transplant*, 2007. **11**(2): p. 160-4.
47. Kochhar, G., et al., *Biliary complications following liver transplantation*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(19): p. 2841-6.
48. Kucera, M., et al., *[Early biliary complications following liver transplantation]*. *Rozhl Chir*, 2011. **90**(2): p. 117-21.
49. Mueller, A.R., K.P. Platz, and B. Kremer, *Early postoperative complications following liver transplantation*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2004. **18**(5): p. 881-900.
50. Stockmann, M., et al., *How to define initial poor graft function after liver transplantation? - a new functional definition by the LiMAX test*. *Transpl Int*, 2010. **23**(10): p. 1023-32.
51. Lock, J.F., et al., *Early diagnosis of primary nonfunction and indication for reoperation after liver transplantation*. *Liver Transpl*, 2010. **16**(2): p. 172-80.
52. Jain, A., et al., *Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center*. *Ann Surg*, 2000. **232**(4): p. 490-500.
53. Nacif, L.S., et al., *Late acute rejection in liver transplant: a systematic review*. *Arq Bras Cir Dig*, 2015. **28**(3): p. 212-5.
54. Thurairajah, P.H., et al., *Late acute liver allograft rejection; a study of its natural history and graft survival in the current era*. *Transplantation*, 2013. **95**(7): p. 955-9.
55. Burra, P. and K.I. Rodriguez-Castro, *Neoplastic disease after liver transplantation: Focus on de novo neoplasms*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(29): p. 8753-68.
56. Dumortier, J., O. Boillot, and J.Y. Scoazec, *Natural history, treatment and prevention of hepatitis C recurrence after liver transplantation: past, present and future*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(32): p. 11069-79.
57. Ghaziani, T., et al., *Hepatitis B and liver transplantation: molecular and clinical features that influence recurrence and outcome*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(39): p. 14142-55.
58. Friman, S., *Recurrence of disease after liver transplantation*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(3): p. 1178-81.
59. Dutkowski, P., et al., *The model for end-stage liver disease allocation system for liver transplantation saves lives, but increases morbidity and cost: a prospective outcome analysis*. *Liver Transpl*, 2011. **17**(6): p. 674-84.
60. He, S., et al., *A role for complement in the enhanced susceptibility of steatotic livers to ischemia and reperfusion injury*. *J Immunol*, 2009. **183**(7): p. 4764-72.
61. Varela, A.T., A.P. Rolo, and C.M. Palmeira, *Fatty liver and ischemia/reperfusion: are there drugs able to mitigate injury?* *Curr Med Chem*, 2011. **18**(32): p. 4987-5002.
62. Yersiz, H., et al., *Assessment of hepatic steatosis by transplant surgeon and expert pathologist: a prospective, double-blind evaluation of 201 donor livers*. *Liver Transpl*, 2013. **19**(4): p. 437-49.
63. Latchana, N., et al., *Preservation solutions used during abdominal transplantation: Current status and outcomes*. *World J Transplant*, 2015. **5**(4): p. 154-64.

64. Parsons, R.F. and J.V. Guarrera, *Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: which is best?* Curr Opin Organ Transplant, 2014. **19**(2): p. 100-7.
65. Adam, R., et al., *Compared efficacy of preservation solutions in liver transplantation: a long-term graft outcome study from the European Liver Transplant Registry.* Am J Transplant, 2015. **15**(2): p. 395-406.
66. Jamieson, N.V., et al., *Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution.* Transplantation, 1988. **46**(4): p. 517-22.
67. D'Alessandro, A.M., et al., *Current status of organ preservation with University of Wisconsin solution.* Arch Pathol Lab Med, 1991. **115**(3): p. 306-10.
68. Lamesch, P., et al., *Preservation of the liver with the HTK solution.* Transplant Proc, 1990. **22**(2): p. 518-9.
69. Gubernatis, G., et al., *HTK-solution (Bretschneider) for human liver transplantation. First clinical experiences.* Langenbecks Arch Chir, 1990. **375**(2): p. 66-70.
70. Mangus, R.S., et al., *Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in extended criteria liver donors.* Liver Transpl, 2008. **14**(3): p. 365-73.
71. Menasche, P., et al., *Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution.* Eur J Cardiothorac Surg, 1994. **8**(4): p. 207-13.
72. Garcia-Gil, F.A., et al., *Celsior versus University of Wisconsin preserving solutions for liver transplantation: postreperfusion syndrome and outcome of a 5-year prospective randomized controlled study.* World J Surg, 2011. **35**(7): p. 1598-607.
73. Le Roy, B., et al., *Dissection technique for selective liver harvesting.* J Visc Surg, 2015. **152**(5): p. 314-20.
74. Laing, R.W., H. Mergental, and D.F. Mirza, *Normothermic ex-situ liver preservation: the new gold standard.* Curr Opin Organ Transplant, 2017. **22**(3): p. 274-280.
75. Ravikumar, R., et al., *Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial.* Am J Transplant, 2016. **16**(6): p. 1779-87.
76. Bae, C., S.D. Henry, and J.V. Guarrera, *Is extracorporeal hypothermic machine perfusion of the liver better than the 'good old icebox'?* Curr Opin Organ Transplant, 2012. **17**(2): p. 137-42.
77. Tacke, F. and R. Weiskirchen, *Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques.* Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **6**(1): p. 67-80.
78. Senoo, H., et al., *Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future.* Cell Biol Int, 2010. **34**(12): p. 1247-72.
79. Gissen, P. and I.M. Arias, *Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease.* J Hepatol, 2015. **63**(4): p. 1023-37.
80. Gerber, M.A. and S.N. Thung, *Histology of the liver.* Am J Surg Pathol, 1987. **11**(9): p. 709-22.
81. Lauth, W.W., in *Hepatic Circulation: Physiology and Pathophysiology.* 2009: San Rafael (CA).
82. Friedman, J.R. and J. Nunnari, *Mitochondrial form and function.* Nature, 2014. **505**(7483): p. 335-43.
83. Amigo, I., et al., *Mitochondrial form, function and signalling in aging.* Biochem J, 2016. **473**(20): p. 3421-3449.
84. Junqueira, L.C., *Biologia Celular e Molecular.* 9ª Edição ed.
85. Mazunin, I.O., et al., *Mitochondrial Matrix Processes.* Biochemistry (Mosc), 2015. **80**(11): p. 1418-28.

86. Larosa, V. and C. Remacle, *Transformation of the mitochondrial genome*. Int J Dev Biol, 2013. **57**(6-8): p. 659-65.
87. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
88. Ye, F., et al., *High-throughput sequencing in mitochondrial DNA research*. Mitochondrion, 2014. **17**: p. 157-63.
89. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Histologia básica*. 6a ed. 2005, Barcelona etc.: Masson.
90. Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt, *Principles of biochemistry*. 2008, John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey. p. 551-580.
91. Loach, P.A., *Oxidation-Reduction Potentials, Absorbance Bands and Molar Absorbance of Compounds Used in Biochemical Studies*, in *Handbook of biochemistry and molecular biology*, R.L. Lundblad and F. Macdonald, Editors. 2010, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 62.
92. Perier, C. and M. Vila, *Mitochondrial biology and Parkinson's disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a009332.
93. Hirst, J., *Energy transduction by respiratory complex I--an evaluation of current knowledge*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 3): p. 525-9.
94. Horsefield, R., S. Iwata, and B. Byrne, *Complex II from a structural perspective*. Curr Protein Pept Sci, 2004. **5**(2): p. 107-18.
95. Calhoun, M.W., J.W. Thomas, and R.B. Gennis, *The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(8): p. 325-30.
96. Yoshikawa, S., et al., *Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1110-6.
97. Junge, W. and N. Nelson, *ATP synthase*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 631-57.
98. Jonckheere, A.I., J.A. Smeitink, and R.J. Rodenburg, *Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology*. J Inherit Metab Dis, 2012. **35**(2): p. 211-25.
99. Bagkos, G., K. Koufopoulos, and C. Piperi, *ATP synthesis revisited: new avenues for the management of mitochondrial diseases*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(28): p. 4570-9.
100. Nelson, D.L., M.M. Cox, and A.L. Lehninger, *Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation*, in *Lehninger : principles of biochemistry*. 2013, W. H. Freeman and Co: New York. p. 690-722.
101. Crichton, P.G., Y. Lee, and E.R. Kunji, *The molecular features of uncoupling protein 1 support a conventional mitochondrial carrier-like mechanism*. Biochimie, 2017. **134**: p. 35-50.
102. Bernardi, P., et al., *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 2934-9.
103. Zoratti, M. and I. Szabo, *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 139-76.
104. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** (Pt 1): p. 93-8.
105. Gunter, T.E., et al., *Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance*. Am J Physiol, 1994. **267**(2 Pt 1): p. C313-39.
106. Balaban, R.S., *The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1334-41.
107. Denton, R.M., *Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1309-16.

108. Sparagna, G.C., et al., *Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode.* J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27510-5.
109. Beutner, G., et al., *Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria.* J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21482-8.
110. Trenker, M., et al., *Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 445-52.
111. Michels, G., et al., *Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca²⁺ uptake by 2 different voltage-gated Ca²⁺ channels.* Circulation, 2009. **119**(18): p. 2435-43.
112. Matlib, M.A., et al., *Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca²⁺ uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes.* J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10223-31.
113. Zorov, D.B., M. Juhaszova, and S.J. Sollott, *Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release.* Physiol Rev, 2014. **94**(3): p. 909-50.
114. Korge, P., et al., *Reactive Oxygen Species Production Induced by Pore Opening in Cardiac Mitochondria: The Role of Complex II.* J Biol Chem, 2017.
115. Lenaz, G., *Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology?* Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 93-136.
116. Gores, G.J., et al., *Swelling, reductive stress, and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes.* Am J Physiol, 1989. **257**(2 Pt 1): p. C347-54.
117. Vakifahmetoglu-Norberg, H., A.T. Ouchida, and E. Norberg, *The role of mitochondria in metabolism and cell death.* Biochem Biophys Res Commun, 2017. **482**(3): p. 426-431.
118. Hacker, G., *The morphology of apoptosis.* Cell Tissue Res, 2000. **301**(1): p. 5-17.
119. Mayer, B. and R. Oberbauer, *Mitochondrial regulation of apoptosis.* News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 89-94.
120. Gillies, L.A. and T. Kuwana, *Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane.* J Cell Biochem, 2014. **115**(4): p. 632-40.
121. Vandenabeele, P., et al., *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 700-14.
122. Lemasters, J.J., et al., *The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 177-96.
123. Bahde, R. and H.U. Spiegel, *Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside.* Br J Surg, 2010. **97**(10): p. 1461-75.
124. Duval, M., et al., *Implication of mitochondrial dysfunction and cell death in cold preservation--warm reperfusion-induced hepatocyte injury.* Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(5): p. 547-54.
125. Teoh, N.C., *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**: p. 180-7.
126. Lentsch, A.B., et al., *Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells.* Hepatology, 1998. **27**(2): p. 507-12.
127. Lentsch, A.B., et al., *Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury.* Hepatology, 2000. **32**(2): p. 169-73.
128. Schlegel, A., P. Kron, and P. Dutkowski, *Hypothermic Oxygenated Liver Perfusion: Basic Mechanisms and Clinical Application.* Curr Transplant Rep, 2015. **2**(1): p. 52-62.

129. Inserte, J., et al., *Ischemic preconditioning prevents calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 364-73.
130. Li, J., et al., *Astaxanthin Pretreatment Attenuates Hepatic Ischemia Reperfusion-Induced Apoptosis and Autophagy via the ROS/MAPK Pathway in Mice*. Mar Drugs, 2015. **13**(6): p. 3368-87.
131. Ghribi, O., et al., *Co-involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis: changes in cytochrome c, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of aluminum-treated rabbits*. Brain Res, 2001. **903**(1-2): p. 66-73.
132. Borutaite, V., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 357-66.
133. Graef, M. and J. Nunnari, *A role for mitochondria in autophagy regulation*. Autophagy, 2011. **7**(10): p. 1245-6.
134. Czaja, M.J., et al., *Functions of autophagy in normal and diseased liver*. Autophagy, 2013. **9**(8): p. 1131-58.
135. Kim, J.S., et al., *Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes*. Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1725-36.
136. Kamo, N., et al., *Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state*. J Membr Biol, 1979. **49**(2): p. 105-21.
137. Rolo, A.P., et al., *Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy*. Toxicol Sci, 2000. **57**(1): p. 177-85.
138. Agrawal, S., R.K. Dhiman, and J.K. Limdi, *Evaluation of abnormal liver function tests*. Postgrad Med J, 2016. **92**(1086): p. 223-34.
139. Woreta, T.A. and S.A. Alqahtani, *Evaluation of abnormal liver tests*. Med Clin North Am, 2014. **98**(1): p. 1-16.
140. Keppler, D., *The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(4): p. 561-5.
141. Nguyen, H.B., et al., *Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock*. Crit Care Med, 2004. **32**(8): p. 1637-42.
142. Borzecki, A.M., et al., *Comparison of in-hospital versus 30-day mortality assessments for selected medical conditions*. Med Care, 2010. **48**(12): p. 1117-21.
143. Dindo, D., N. Demartines, and P.A. Clavien, *Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey*. Ann Surg, 2004. **240**(2): p. 205-13.
144. Palmeira, C.M., A.J. Moreno, and V.M. Madeira, *Interactions of herbicides 2,4-D and dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics*. Toxicol Appl Pharmacol, 1994. **127**(1): p. 50-7.
145. Palmeira, C.M. and K.B. Wallace, *Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **143**(2): p. 338-47.
146. Yoon, S.Y., et al., *Protective effect of ischemic postconditioning against hepatic ischemic reperfusion injury in rat liver*. Ann Surg Treat Res, 2015. **88**(5): p. 241-5.
147. Peralta, C., M.B. Jimenez-Castro, and J. Gracia-Sancho, *Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu*. J Hepatol, 2013. **59**(5): p. 1094-106.
148. Hu, C. and L. Li, *Pre-conditions for eliminating mitochondrial dysfunction and maintaining liver function after hepatic ischaemia reperfusion*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(9): p. 1719-1731.

149. Huet, P.M., et al., *Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver*. *Hepatology*, 2004. **39**(4): p. 1110-9.
150. Ligeret, H., et al., *Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury*. *J Ethnopharmacol*, 2008. **115**(3): p. 507-14.
151. Teoh, N.C. and G.C. Farrell, *Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **18**(8): p. 891-902.
152. Lafaro, K., et al., *Defining Post Hepatectomy Liver Insufficiency: Where do We stand?* *J Gastrointest Surg*, 2015. **19**(11): p. 2079-92.
153. Furuyama, T., et al., *Preoperative direct bilirubin to prothrombin time ratio index to prevent liver failure after minor hepatectomy*. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2016. **23**(12): p. 763-770.
154. Zhang, Z. and X. Xu, *Lactate clearance is a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis**. *Crit Care Med*, 2014. **42**(9): p. 2118-25.
155. Oldenbeuving, G., et al., *A patient with acute liver failure and extreme hypoglycaemia with lactic acidosis who was not in a coma: causes and consequences of lactate-protected hypoglycaemia*. *Anaesth Intensive Care*, 2014. **42**(4): p. 507-11.
156. Lee, S., et al., *A technique for orthotopic liver transplantation in the rat*. *Transplantation*, 1973. **16**(6): p. 664-9.
157. Chen, J., et al., *A review of various techniques of mouse liver transplantation*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(6): p. 2517-21.
158. Qian, S.G., et al., *Orthotopic liver transplantation in the mouse*. *Transplantation*, 1991. **52**(3): p. 562-4.
159. Bell, R.M., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **50**(6): p. 940-50.
160. Ferreira, F.M., et al., *Alterations of liver mitochondrial bioenergetics in diabetic Goto-Kakizaki rats*. *Metabolism*, 1999. **48**(9): p. 1115-9.
161. Marecki, H., et al., *Liver ex situ machine perfusion preservation: A review of the methodology and results of large animal studies and clinical trials*. *Liver Transpl*, 2017. **23**(5): p. 679-695.
162. Karimian, N., et al., *Ex Situ Normothermic Machine Perfusion of Donor Livers*. *J Vis Exp*, 2015(99): p. e52688.
163. Burlage, L.C., et al., *Oxygenated hypothermic machine perfusion after static cold storage improves endothelial function of extended criteria donor livers*. *HPB (Oxford)*, 2017. **19**(6): p. 538-546.
164. Barbas, A.S., et al., *Ex-vivo liver perfusion for organ preservation: Recent advances in the field*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2016. **30**(3): p. 154-60.
165. Dutkowski, P., et al., *Challenges to liver transplantation and strategies to improve outcomes*. *Gastroenterology*, 2015. **148**(2): p. 307-23.
166. Schlegel, A., et al., *Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts*. *J Hepatol*, 2014. **61**(6): p. 1267-75.
167. Bigelow, W.G., J.C. Callaghan, and J.A. Hopps, *General hypothermia for experimental intracardiac surgery; the use of electrophrenic respirations, an artificial pacemaker for cardiac standstill and radio-frequency rewarming in general hypothermia*. *Ann Surg*, 1950. **132**(3): p. 531-9.
168. Miao, Y.F., et al., *5'-adenosine monophosphate-induced hypothermia attenuates brain ischemia/reperfusion injury in a rat model by inhibiting the inflammatory response*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 520745.

169. Xiao, Q., et al., *Mild hypothermia pretreatment protects against liver ischemia reperfusion injury via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway*. Mol Med Rep, 2017. **16**(5): p. 7520-7526.
170. Azoulay, D., et al., *In situ hypothermic perfusion of the liver versus standard total vascular exclusion for complex liver resection*. Ann Surg, 2005. **241**(2): p. 277-85.
171. Behrends, M., et al., *Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats*. Liver Int, 2006. **26**(6): p. 734-41.
172. Niemann, C.U., et al., *Mild hypothermia protects obese rats from fulminant hepatic necrosis induced by ischemia-reperfusion*. Surgery, 2006. **140**(3): p. 404-12.
173. Domitrovic, R., H. Jakovac, and G. Blagojevic, *Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF-alpha, COX-2, and iNOS expression in CCl(4)-intoxicated mice*. Toxicology, 2011. **280**(1-2): p. 33-43.
174. Imenshahidi, M. and H. Hosseinzadeh, *Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review*. Phytother Res, 2016. **30**(11): p. 1745-1764.
175. Kong, W.J., et al., *Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression*. Metabolism, 2009. **58**(1): p. 109-19.
176. Zhang, B.J., et al., *Protection by and anti-oxidant mechanism of berberine against rat liver fibrosis induced by multiple hepatotoxic factors*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(3): p. 303-9.
177. Sheng, M., et al., *Protective effect of Berberine pretreatment in hepatic ischemia/reperfusion injury of rat*. Transplant Proc, 2015. **47**(2): p. 275-82.
178. Houtkooper, R.H., E. Pirinen, and J. Auwerx, *Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 225-238.
179. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
180. Tang, B.L., *Sirt1 and the Mitochondria*. Mol Cells, 2016. **39**(2): p. 87-95.
181. Choudhury, M., K.R. Jonscher, and J.E. Friedman, *Reduced mitochondrial function in obesity-associated fatty liver: SIRT3 takes on the fat*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(2): p. 175-8.
182. Teodoro, J.S., et al., *Berberine reverts hepatic mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats: a possible role for SirT3 activation*. Mitochondrion, 2013. **13**(6): p. 637-46.
183. Ahn, B.H., et al., *A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14447-52.
184. Hirschey, M.D., et al., *SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 177-90.
185. Villena, J.A., *New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond*. FEBS J, 2015. **282**(4): p. 647-72.
186. Kadenbach, B. and M. Huttemann, *The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase*. Mitochondrion, 2015. **24**: p. 64-76.
187. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-5.
188. Romao, S. and C. Munz, *LC3-associated phagocytosis*. Autophagy, 2014. **10**(3): p. 526-8.
189. Wang, K., *Autophagy and apoptosis in liver injury*. Cell Cycle, 2015. **14**(11): p. 1631-42.

190. Farkas, S., C. Hackl, and H.J. Schlitt, *Overview of the indications and contraindications for liver transplantation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(5).
191. Neuberger, J., *An update on liver transplantation: A critical review*. J Autoimmun, 2016. **66**: p. 51-9.
192. Zapletal, C., et al., *Does the liver ever age? Results of liver transplantation with donors above 80 years of age*. Transplant Proc, 2005. **37**(2): p. 1182-5.
193. Jimenez-Romero, C., et al., *Octogenarian liver grafts: Is their use for transplant currently justified?* World J Gastroenterol, 2017. **23**(17): p. 3099-3110.
194. Jimenez-Castro, M.B., J. Gracia-Sancho, and C. Peralta, *Brain death and marginal grafts in liver transplantation*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1777.
195. Kupiec-Weglinski, J.W. and R.W. Busuttil, *Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation*. Transplant Proc, 2005. **37**(4): p. 1653-6.
196. Weigand, K., et al., *Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology*. HPB Surg, 2012. **2012**: p. 176723.
197. Hoti, E., C. Salloum, and D. Azoulay, *Hepatic resection with in situ hypothermic perfusion is superior to other resection techniques*. Dig Surg, 2011. **28**(2): p. 94-9.
198. Zhang, S., et al., *SIRT6 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis and autophagy related cell death*. Free Radic Biol Med, 2017. **115**: p. 18-30.
199. Ma, Z., et al., *Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(21): p. 3989-3998.
200. Shin, J.K. and S.M. Lee, *Genipin protects the liver from ischemia/reperfusion injury by modulating mitochondrial quality control*. Toxicol Appl Pharmacol, 2017. **328**: p. 25-33.
201. Teoh, N.C., et al., *Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of Diannexin (ASP8597)*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e104376.
202. Pasut, G., et al., *Polyethylene glycols: An effective strategy for limiting liver ischemia reperfusion injury*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(28): p. 6501-8.
203. Khader, A., et al., *Sirtuin 1 Stimulation Attenuates Ischemic Liver Injury and Enhances Mitochondrial Recovery and Autophagy*. Crit Care Med, 2016. **44**(8): p. e651-63.
204. Verdin, E., et al., *Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(12): p. 669-75.
205. Li, X. and N. Kazgan, *Mammalian sirtuins and energy metabolism*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(5): p. 575-87.
206. Wu, Z. and O. Boss, *Targeting PGC-1 alpha to control energy homeostasis*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(10): p. 1329-38.
207. Arnold, S., *The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 46-56.