

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

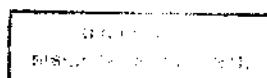
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**ATUAÇÃO DO *WEB 2086* COMO INIBIDOR DA AÇÃO DO
FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA (*PAF*) EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS À ISQUEMIA HEPÁTICA SELETIVA
NORMOTÉRMICA E REPERFUSÃO**

ILKA DE FATIMA SANTANA FERREIRA BOIN

CAMPINAS - SÃO PAULO

1997



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**ATUAÇÃO DO *WEB 2086* COMO INIBIDOR DA AÇÃO DO FATOR DE
ATIVACÃO PLAQUETÁRIA (*PAF*) EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
ISQUEMIA HEPÁTICA SELETIVA NORMOTÉRMICA E REPERFUSÃO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Cirurgia da Faculdade de
Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Doutor em Cirurgia.

ILKA DE FATIMA SANTANA FERREIRA BOIN

Orientador: Prof. Dr. Orlando Castro e Silva Jr.

**Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**

CAMPINAS - SÃO PAULO

1997

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B637d Boin, Ilka de Fatima Santana Ferreira
Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação
plaquetária (PAF) em ratos Wistar submetidos à isquemia hepática
seletiva normotérmica e reperfusão / Ilka de Fatima Santana
Ferreira Boin. Campinas, SP :[s.n.], 1997.

Orientador: Orlando Castro e Silva Jr.
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1.mitocôndrias. 2. Isquemia. 3. Monitorização hemodinâmica.
I. Orlando Castro e Silva Jr. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORAMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. ORLANDO CASTRO E SILVA JR.

MEMBROS:

ORLANDO CASTRO E SILVA JR.

LUIZ SÉRGIO LEONARDI

DOMINGO MARCOLINO BRAILE

SERGIO MIES

JÚLIO CÉSAR UILI COELHO

Assinatura de Júlio César Uili Coelho

**Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

DATA: 30 Abril de 1997

À minha querida mãe (in memoriam),

pela oportunidade da vida,

pelo exemplo de mãe e de mulher.

Ao meu pai,

pelo carinho e sinceridade.

Ao meu marido,

companheiro de todos os momentos,

pelo carinho, apoio, e compreensão.

Aos meus filhos,

Pedro Daniel, Paulo Henrique, Elisa Aurora e André Otávio,

luzes que brilham com o Sol a cada amanhecer e

desde cedo procuraram compreender minha dedicação aos meus doentes

e à minha profissão, principalmente, durante este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitos auxiliaram na realização deste trabalho e a contribuição inestimável sempre apareceu quando necessária.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, pela amizade sincera, pela responsabilidade na minha formação cirúrgica e por seu exemplo de dedicação à carreira universitária.

Ao Prof. Dr. Orlando Castro e Silva Jr. pela orientação fiel, dedicada e segura e pela sua contínua disposição na procura do conhecimento científico e, acima de tudo, pela receptividade de sua família à minha pessoa e a inestimável amizade.

Às bioquímicas do Núcleo de Hepatologia Cirúrgica do Setor de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Maria Eliza Jordani de Souza, Maria Aparecida Neves Cardoso Picinato, Clarice Fina Fleury Franco e Alexandra Vieira Dias, pela contribuição na avaliação bioquímica sérica, pela amizade, compreensão e colaboração.

Ao Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli, chefe do Setor de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aos técnicos Maria Cecília Rocha, Sebastião Assis Mazzetto, José Carlos Vanni, Paulo Alves Junior, Hermes Murtha Oliveira e Wagner Andrade de Oliveira.

Ao Prof. Dr. Antonio Cardoso dos Santos, chefe do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e sua esposa, Neife Aparecida Guinain dos Santos, pela prestimosa avaliação da lipoperoxidação do conteúdo mitocondrial.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira, chefe do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e, principalmente, aos técnicos Ana Cristina de Moraes, William Adalberto Silva e Miguel Luiz Cândido, pelo apoio, incentivo e dedicação nas laboriosas horas extras de trabalho.

À Gracinda de Lourdes Jorge, técnica do Laboratório Experimental da Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

À Prof. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, pela avaliação histológica, pelo cuidadoso e dedicado trabalho, pelo carinho e amizade.

Ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Edson Antunes, pela doação da droga *WEB 2086*, pela orientação farmacológica, pelo apoio, pela amizade.

À Comissão de Pesquisa pelo auxílio na análise estatística, em especial a Profª Dra. Marcia Siol, professora visitante da Universidade de Seattle/USA e Hélio José de Abreu.

À Veronica Paternost pela revisão de texto e ortografia.

*"O homem só será capaz de interpretar o que
encontra quando souber o que procura"*

Claude Bernard
(1813 - 1878)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO	3
1.2 DADOS DA LITERATURA.....	4
1.2.1 Fator de Ativação Plaquetária (<i>PAF</i>).....	13
1.2.2 Antagonistas Específicos do Fator de Ativação Plaquetária (<i>PAF</i>).....	15
1.2.2.1 <i>WEB 2086</i>	15
1.2.2.2 Outros antagonistas específicos do <i>PAF</i>	16
1.2.2.3 <i>SRI 63441</i>	16
1.2.2.4 <i>CV 6209</i>	17
1.2.2.5 <i>WEB 2170</i>	18
1.2.2.6 <i>BN 52021 e 52022</i>	18
1.2.2.7 <i>TCV 309</i>	19
1.2.2.8 <i>E 5880</i>	19
2. MÉTODO.....	22
2.1 ANIMAIS ESTUDADOS.....	22
2.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS.....	22
2.2.1 Grupo A	22
2.2.2 Grupo B	24
2.3 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO.....	25

2.3.1 Técnica Anestésica.....	25
2.3.2 Técnica Operatória	26
2.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE.....	27
2.4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)	27
2.4.2 Alanina-Aminotransferase (ALT)	27
2.4.3 Fração 5 da Desidrogenase Láctica (DHL ₅).....	28
2.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA TECIDUAL HEPÁTICA	28
2.5.1 Avaliação da Função Mitocondrial	28
2.5.1.1 Preparação das Mitocôndrias	28
2.5.1.2 Determinação da concentração de proteína mitocondrial	29
2.5.1.3 Determinação do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas..	29
2.5.2 Avaliação da Lipoperoxidação Mitocondrial	29
2.5.2.1 Determinação do conteúdo hepático de malondialdeído (MDA)	30
2.5.2.2 Determinação do conteúdo hepático de glutathione reduzida (GSH)	30
2.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	31
2.7 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	31
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3. RESULTADO	35
3.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE.....	35
3.1.1 Aspartato Aminotransferase (AST)	35
3.1.2 Alanina Aminotransferase (ALT)	37

3.1.3 Fração 5 da Desidrogenase Láctica (DHL ₅).....	37
3.2 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA TECIDUAL HEPÁTICA.....	40
3.2.1 Avaliação da Função Mitocondrial.....	40
3.2.1.1 Consumo de oxigênio no estado III da respiração mitocondrial (EIII)	40
3.2.1.2 Consumo de oxigênio no estado IV da respiração mitocondrial (EIV)....	42
3.2.1.3 Razão de controle respiratório (RCR).....	44
3.2.2 Avaliação da Lipoperoxidação Mitocondrial	46
3.2.2.1 Conteúdo hepático de malondialdeído (MDA)	46
3.2.2.2 Conteúdo hepático de glutathione (GSH).....	48
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA	50
3.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	57
3.4.1 Pressão Arterial Média (PAM).....	57
3.4.2 Pressão Venosa Central (PVC)	57
4. DISCUSSÃO	60
5. CONCLUSÃO.....	78
6. SUMMARY.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. APÊNDICE	111

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Esquema hipotético dos mecanismos de liberação do <i>PAF</i>	21
Quadro 2 - Esquema de planejamento experimental.....	23
Quadro 3 - Esquema de administração do <i>WEB 2086</i>	23
Figura 1 - Gráfico de interferência para AST (UI/L).....	36
Figura 2 - Gráfico de interferência para ALT (UI/L).....	38
Figura 3 - Gráfico de interferência para DHL ₅ (UI/L).....	39
Figura 4 - Gráfico de interferência para E III ($\mu\text{mol de O}_2 / \text{mg proteína} \cdot 10^{-3}$).....	41
Figura 5 - Gráfico de interferência para E IV ($\mu\text{mol de O}_2 / \text{mg proteína} \cdot 10^{-3}$).....	43
Figura 6 - Gráfico de interferência para RCR.....	45
Figura 7 - Gráfico de interferência para MDA (nmol / mg proteína).....	47
Figura 8 - Gráfico de interferência para GSH (nmol / mg proteína).....	49
Figura 9 - Gráfico de frequência do grau de congestão.....	51
Figura 10 - Gráfico de frequência do grau de vacuolização citoplasmática.....	52
Figura 11 - Gráfico de frequência do grau de necrose.....	53
Figura 12 - Gráfico de frequência da presença de polimorfonucleares neutrófilos.....	54
Figura 13 - Aspectos microscópicos (subgrupo A4/R15).....	55
Figura 14 - Aspectos microscópicos (subgrupo B4/R15).....	56
Figura 15 - Gráfico de interferência para PAM (mmHg).....	58
Figura 16 - Gráfico de interferência para PVC (cmH ₂ O).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
CSA	ciclosporina
DHL	desidrogenase láctica
DHL ₅	fração 5 da desidrogease láctica
DTNB	di-nitrobenzeno
E III	estado III da respiração mitocondrial
E IV	estado IV da respiração mitocondrial
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FK 506	imunossupressor macrolídeo
FoF1-ATP	ATPase mitocondrial
GMP-140	seletina
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HSD	diferença honestamente significativa
ICAM 1 e 2	molécula de adesividade intracelular
IL	interleucina
KCL	cloreto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
LAF-1	fator de ativação leucocitária
MDA	malondialdeído
MgADP	adenina 5'difosfato-magnésio
NAD	dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (reduzida)
NADPH	dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato (reduzida)
NBT	corante azul de nitro-tetrazolium

NO	óxido nítrico
O ₂ [°]	ânion supeóxido
OH [°]	radical hidroxila
PAF	fator de ativação plaquetária
PAM	pressão arterial média
PCOOH	peróxido de fosfatidil colina
PGE1	prostaglandina E1
PGF1- α	prostaglandina F1- α
PMN	polimorfonuclear neutrófilo
PNP	nucleotídeo de purina-fosfato
PVC	pressão venosa central
RCR	razão de controle respiratório
RLO	radicais livre de oxigênio
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SH	grupo sulfidrila
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TMP	tetra-metoxipropano
TNF	fator de necrose tumoral
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
XD	xantina desidrogenase
XO	xantina oxidase

RESUMO

RESUMO

A oclusão vascular temporária do fluxo hepático é um dos procedimentos essenciais na cirurgia hepática. A reperfusão do tecido hepático isquêmico está associada a distúrbios circulatórios sistêmicos e aumento da permeabilidade vascular, edema, desarranjo estrutural hepatocelular, podendo, na dependência do tempo de isquemia ocorrer morte celular. Isto acontece devido à geração de mediadores inflamatórios como o fator de ativação plaquetária (*PAF*).

O objetivo deste trabalho foi verificar a efetividade do *WEB 2086*, como protetor das lesões oriundas da liberação do *PAF*, após 60 e 90 minutos de isquemia hepática seletiva normotérmica e 60 minutos de reperfusão.

Foram usados 192 ratos Wistar para estudo da avaliação bioquímica sérica pelas dosagens de AST, ALT e DHL₅. Avaliou-se a função mitocondrial (consumo de O₂ nos estados III e IV da respiração mitocondrial e a relação E III/E IV = razão de controle respiratório (RCR), a lipoperoxidação do conteúdo hepático (glutathiona e malondialdeído) e realizou-se a análise histológica das biópsias hepáticas. Outros 48 ratos foram usados para avaliação hemodinâmica. Os animais foram submetidos à isquemia hepática seletiva normotérmica por pinçamento do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo. Os animais foram distribuídos em dois grupos. Os animais do grupo A receberam soro fisiológico cinco minutos antes da isquemia e os do grupo B receberam *WEB 2086* (10 mg/kg peso corpóreo). Os animais dos subgrupos isquêmicos de 60 minutos foram A2 e B2 e seus subgrupos controle foram A1 e B1. Os dos subgrupos isquêmicos de 90 minutos foram A4 e B4 e seus subgrupos controle foram A3 e B3. O estudo foi realizado no início do experimento (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) minutos e 60 (R60) minutos da reperfusão.

Observou-se que as dosagens das enzimas AST, ALT e DHL₅ foram elevadas após a reperfusão em todos os subgrupos isquêmicos. Os valores do E III foram maiores no subgrupo isquêmico B2 em relação ao subgrupo A2 (R15) e no E IV esta diferença foi observada aos 15 e 60 minutos da reperfusão. A RCR dos subgrupos isquêmicos A2 e A4 foi menor do que a de seus subgrupos controle (R0). Os valores de malondialdeído (MDA) do subgrupo isquêmico A4 foi maior após 15 minutos de reperfusão do que no período isquêmico. Os valores da glutathiona (GSH) do subgrupo isquêmico B4 foi maior

que a do subgrupo A4 (R15). O grau de congestão hepática foi maior nos subgrupos isquêmicos em relação aos subgrupos controle após o início da reperfusão. O grau da vacuolização citoplasmática dos subgrupo B4 e B2 foi maior que a dos subgrupos A4 (R0) e B1(R15). Os valores da pressão arterial média do subgrupo A4 foram menores que a dos subgrupos B4 e A3 aos 15 minutos de reperfusão. Os valores da pressão venosa central do subgrupo B4 foram maiores que os do subgrupo A4.

Concluiu-se que a droga *WEB 2086* inibiu o efeito hipotensor do fator de ativação plaquetária (*PAF*) e a lipoperoxidação do conteúdo mitocondrial ocorridos nos animais submetidos a 90 minutos de isquemia e 15 minutos de reperfusão.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As ressecções hepáticas tornaram-se, quando necessárias, mais radicais, evoluindo de simples segmentectomias até grandes ressecções, com utilização de circulação extra-corpórea veno-venosa (HAMAZAKI, *et al.*, 1995). A utilização de técnicas adequadas e hemostasia rigorosa são primordiais. Procurando reduzir o sangramento, que pode advir deste procedimento cirúrgico, utiliza-se a exclusão vascular hepática segmentar ou total, de modo contínuo ou intermitente (HUGUET, STIPA, GAVELLI, 1994). A exclusão vascular temporária submete o parênquima hepático remanescente a um período de isquemia normotérmica e ulterior reperfusão tecidual. Seguem-se, assim, alterações bioquímicas teciduais e séricas que são devidas à isquemia/reperfusão.

Apesar dos grandes avanços obtidos com o transplante hepático como opção terapêutica na hepatopatia crônica, tais como o advento de novas drogas imunossupressoras, avanços táticos e técnicos e elaboração de novas soluções de preservação de órgãos, as alterações que se seguem à isquemia/reperfusão continuam desafiando a argúcia dos pesquisadores, tanto no estudo da sua etiopatogenia como na busca de meios para preveni-la ou coibi-la.

As alterações observadas após o período de isquemia/reperfusão traduzem-se por distúrbios da microcirculação, hipotensão, elevação das aminotransferases séricas, da desidrogenase láctica, disfunção mitocondrial, aumento da lipoperoxidação, alteração da estrutura da célula e morte celular. Estas alterações são consequência de uma interação complexa entre depleção de ATP, influxo intracelular de íons, distúrbios microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, radicais livres de oxigênio, ativação de neutrófilos, plaquetas, células de Kupffer e células endoteliais, que são indutores da liberação de proteases e fosfolipases, que potencialmente danificam as membranas celulares e mitocondriais (ATALLA *et al.*, 1985; WARD, 1991; BULKLEY, 1994; GRACE, 1994).

O fator de ativação plaquetária (PAF) é um destes mediadores inflamatórios liberados durante a isquemia/reperfusão. Sua síntese é estimulada na vigência de peróxido de hidrogênio (KUBES, SUZUKI, GRANGER, 1990b), tem potente ação, direta ou indiretamente, sobre a adesão leucocitária junto ao endotélio microvascular, interferindo

na permeabilidade e vasodilatação, sendo um dos agentes dos distúrbios microcirculatórios que são observados na isquemia/reperfusão hepática (ONTELL *et al.*, 1989; FUKUOKA *et al.*, 1992; NISHIYAMA *et al.*, 1993).

Buscando inibir as ações causadas pelo *PAF* foram estudados diversos antagonistas específicos do mesmo, que são utilizados no período pré-isquêmico e relatados como protetores da função mitocondrial, diminuindo a lipoperoxidação, evitando a hipotensão e as alterações da morfologia celular (ZHOU *et al.*, 1992; BOROBIA *et al.*, 1993; FUKUOKA, NAKAJIMA, NAKANO, 1995).

1.1 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito do *WEB 2086* como antagonista específico do fator de ativação plaquetária (*PAF*), atuando como protetor da isquemia/reperfusão do fígado, avaliando-se variáveis bioquímicas séricas, teciduais hepáticas, histopatológicas e hemodinâmicas decorrentes da isquemia/reperfusão, após diferentes períodos de isquemia hepática normotérmica seletiva induzida experimentalmente em ratos.

1.2 DADOS DA LITERATURA

"Blood ... appears to carry life... every part of the body, for whenever the whole or a part is deprived of fresh blood it very soon dies".

** John Hunter (1835)*

As lesões isquêmicas e pós-reperfusionais podem aparecer em vários órgãos: coração (STEWART *et al.*, 1988), intestino (PARKS *et al.*, 1982; GRANGER *et al.*, 1986), pulmões (TAYLOR, MARTIN, PARKER, 1983), rins (BAKER, CORRY, AUTOR, 1985) e no fígado (PARKS, BULKLEY, GRANGER, 1983; PARKS & GRANGER, 1988; MARZI *et al.*, 1989; ATALLA *et al.*, 1985; ROSSER & GORES, 1995).

O pinçamento da tríade portal foi descrita por PRINGLE em 1908, quando publicou os oito primeiros casos submetidos a esta manobra. Desde então passou a ser utilizada pelos cirurgiões para a obtenção da exclusão vascular hepática. Esta tem sido utilizada em ferimentos hepáticos, ressecções hepáticas segmentares ou amplas e nos transplantes hepáticos (CANNON, 1956; STARZL *et al.*, 1963; GOTOH *et al.*, 1994; HUGUET, GAVELLI, BONA, 1994).

Com a evolução da cirurgia hepática, de simples ressecções até o transplante hepático, novas técnicas de ressecção foram utilizadas com a exclusão vascular segmentar ou total, de fígados normais ou cirróticos, com diferentes tempos de reperfusão (intermitente ou contínua). Obteve-se assim bons resultados, por minimizar o sangramento intra-operatório, com menores índices de morbidade e mortalidade pós-operatória (BISMUTH, HOUSSIN, MAZMANIAN, 1983; EZAKI, *et al.*, 1992; HANNOUN, *et al.*, 1993; HUGUET *et al.*, 1994; HEFFRON & EMOND, 1995; NAGASUE, *et al.*, 1995; BECHSTEIN, *et al.*, 1996; MOUSSA, *et al.*, 1996).

As alterações enzimáticas que acontecem no período pós-operatório, são consequências da hipóxia tissular hepática e da reperfusão do parênquima remanescente. Estas alterações, decorrentes da isquemia normotérmica e da reperfusão, têm sido estudadas

* HUNTER, J. *apud*: GRACE, P.A. - *Ischaemia - reperfusion injury*. *Br. J. Surg.*, 81: 637-647, 1994.

experimentalmente. Como a veia porta é responsável por 75% da nutrição do fígado e a artéria hepática pelos 25% restantes, o pinçamento total destes vasos abole teoricamente todo o suprimento vascular hepático. Uma pequena quantidade de suprimento sanguíneo do fígado pode ser obtido por colaterais existentes entre o órgão e o revestimento peritoneal e retrogradamente pelas veias hepáticas (KIM *et al.*, 1995).

Com a utilização da exclusão vascular hepática total, durante longos períodos, observou-se necrose hepática e morte dos animais em experimentação (MARKOWITZ, RAPPAPORT, SCOTT, 1949; CHAU, GOLDBLOOM, GURD, 1951; MARKOWITZ, 1952). Concomitantemente, novos trabalhos surgiram mostrando a tolerância dos animais submetidos a isquemia hepática temporária, com tempo menor que 60 minutos e com reperfusão intermitente, evitando a anaerobiose, proliferação bacteriana e sequestração no leito vascular esplâncnico (RAFFUCCI & WAGENSTEEN, 1950; RAFFUCCI, 1953, STEINER & MARTINEZ, 1961; BACKLUND *et al.*, 1964; NORDLINGER *et al.*, 1980)

Vários trabalhos utilizaram tempos de isquemia hepática que variaram de uma a quatro horas e com diferentes tempos de reperfusão. Nem todos estudaram as alterações que ocorreram "in vivo". Alguns estudaram a perfusão isolada hepática, outros utilizaram a reoxigenação diretamente nas células hepáticas isoladas. Porém o que todos procuram explicar são os tipos de lesões que podem ocorrer, e quais os fenômenos inflamatórios que são modulados durante a isquemia e após a reperfusão do fígado (NAKATA *et al.*, 1971; MARUBAYASHI *et al.*, 1986; ONTELL *et al.*, 1989; LITTAUER & DE GROOT, 1992; KAWAMURA *et al.*, 1995; BOIN, LEONARDI, CASTRO E SILVA, 1996).

Estas alterações, dependendo do tempo da isquemia e do momento da reperfusão estudados, podem mostrar desde simples alterações bioquímicas até necrose e morte celular (McKEOWN *et al.*, 1988; ONTELL *et al.*, 1989; EGASHIRA *et al.*, 1992; SHIRATORI, *et al.*, 1994; KU *et al.*, 1995).

Vários tipos de células estão presentes no fígado, como, os hepatócitos, as células de Kupffer, as células endoteliais sinusoidais e as células dos ductos biliares, que são suscetíveis à injúria da isquemia/preservação. A resposta à agressão pode ser dependente da temperatura, do tempo de isquemia a que foram submetidas, do tipo de meio de

preservação utilizado e do tempo e reoxigenação utilizado. Estas variações foram explicadas pela diferente atividade metabólica das células do fígado e variedade de proteases intracelulares que podem ser ativadas (McKEOWN *et al.*, 1988; NOACK *et al.*, 1993)

A isquemia induzida durante o transplante ortotópico do fígado é composta pela isquemia normotérmica e pela isquemia fria, que resultam em dois tipos diferentes de lesões (McKEOWN *et al.*, 1988; ONTELL *et al.*, 1989).

Na isquemia normotérmica ocorre vacuolização citoplasmática, congestão sinusoidal e, dependendo do tempo da isquemia, focos de necrose e infiltração gordurosa (ORRENIUS *et al.*, 1976; CARVALHO *et al.*, 1978; SHIBAYAMA, ASAKA, NISHIJIMA, 1991; ABOIM *et al.*, 1993; HUI *et al.*, 1994). À microscopia eletrônica nota-se espaçamento das membranas e aparecimento de vesículas sem ruptura dos sinusóides (BASSI & BERNELLI-ZAZZERA, 1964; MARZELLA & GLAUMANN, 1981). Estas lesões foram reversíveis quando o tempo isquêmico foi curto e o fluxo hepático restaurado (POGGETTI, 1987).

Na isquemia hipotérmica há edema celular e ruptura das células sinusoidais, mesmo com a morfologia hepatocelular aparentemente normal, daí a necessidade de associar-se à hipotermia as soluções de preservação de órgãos (LINDELL *et al.*, 1989; MARSH *et al.*, 1989). Mesmo com o emprego de soluções de preservação têm-se observado, à microscopia eletrônica, alterações estruturais endoteliais reversíveis, edema celular, alargamento das fenestrações, retração das extensões citoplasmáticas, ruptura endotelial, edema mitocondrial, presença de vesículas junto a matriz mitocondrial e na manutenção da injúria após longo tempo de isquemia pode ocorrer a morte celular (McKEOWN *et al.*, 1988; CLAVIEN, HARVEY, STRASBERG, 1992; RAUEN *et al.*, 1993).

Em estudo realizado com células hepáticas isoladas de rato e humanos CARACENI *et al.* (1994) relataram que após anóxia-reoxigenação os hepatócitos humanos são mais resistentes que os do ratos, com menor geração de radicais livres de oxigênio e lipoperoxidação.

A terapêutica da hipóxia é a reperusão. Quando esta não acontece, a ausência de oxigênio como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial interrompe imediatamente o fluxo de elétrons, causando a oxido-redução da cadeia respiratória,

contrariamente à oxidação que ocorre em condições normais (GONZALEZ-FLECHA, CUTRIN, BOVERIS, 1993).

A isquemia hepática instaurada resulta em metabolismo anaeróbico, a produção de ATP diminui, ocorre maior formação de hipoxantina, aumenta o influxo de cálcio, ocorre ativação das fosfolipases, maior permeabilidade da membrana mitocondrial e alterações no sistema de fosforilação oxidativa (WEISS, 1986; MITTNACHT, SHERMAN, FARBER, 1979; VERCESI, 1993; GRACE, 1994)

A depleção de ATP que ocorre resulta em acidose intracelular, em decorrência da glicólise anaeróbica e consequente acúmulo de ácido láctico (WOODS & KREBS, 1971). A acidose intracelular inicial, em níveis moderados, pareceu funcionar como citoproteção por inibir a atividade das hidrolases (GORLA *et al.* 1983; GORES, HERMAN, LEMASTERS, 1990).

Apesar da depleção de ATP estar diretamente relacionada à duração da isquemia, a velocidade de restauração da oxigenação, após a reperfusão, foi um dos fatores determinantes da viabilidade da função hepática (KAMIIKE *et al.*, 1988; METZGER & LAUTERBURG, 1988). A isquemia acarreta a perda dos mecanismos de homeostase intracelular que são dependentes de energia, perda de gradiente osmótico por inativação das bombas iônicas, inativação de proteínas e oxidação dos grupos tióis (ROSSER & GORES, 1995). A inibição das enzimas $\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ e $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}/\text{ATPase}$ determina edema celular e formação de vesículas, alterando a estrutura da microcirculação. Ocorre oxidação dos grupos sulfidrilas (SH), liberação de radicais livres de oxigênio, podendo causar reperfusão tecidual inadequada e graus diferentes de lesão da membrana celular. (GOES *et al.*, 1990; KOO *et al.*, 1992).

Há cerca de 15 anos DEL MAESTRO (1980) e GRANGER, RUTILI, MCCORD (1981) demonstraram a presença de radicais livres de oxigênio com número ímpar de elétrons altamente reativos: O_2° (ânio superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e OH° (radical hidroxila). A lesão gerada pelo binômio isquemia/reperfusão é causada por estes radicais citotóxicos (BULKLEY, 1987; FREEMAN & CRAPO, 1982; PARKS *et al.*, 1983; PARKS & GRANGER, 1988). Em condições de isquemia/reperfusão, a geração destes radicais livres de oxigênio (RLO) promove, além de uma série de alterações no órgão isquêmico, (MCCORD, 1985; BLANKESTEIJN & TERPSTRA, 1991; KUNZ *et al.*,

1991; WARD, 1991; GRACE, 1994), alterações sistêmicas, tais como falência renal (KUDO *et al.*, 1993), e depressão cárdio-circulatória (PRETTO, 1991; RIZZO, 1996).

GRANGER *et al.* (1981) propuseram que a conversão de xantina desidrogenase (XD) em xantina oxidase (XO) nos tecidos isquêmicos era seguida de aparecimento de hipoxantina durante a reperfusão, e responsável pela formação de ânions superóxidos e peróxidos de hidrogênio. Durante a isquemia os níveis tissulares de hipoxantina aumentam. A XO utiliza O₂ para converter hipoxantina em xantina, liberando superóxido neste processo (GRACE, 1994). Após a reperfusão os RLO produzidos interagem com ferro e catalisam a conversão de peróxido de hidrogênio de H₂O₂ para radicais hidroxila (quadro 1).

As alterações que ocorrem nos organismos que são submetidos à isquemia hepática normotérmica e posterior reperfusão, mostram uma interação complexa entre alterações microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, radicais livres de oxigênio, ativação de neutrófilos, plaquetas, células de Kupffer e células sinusoidais endoteliais (JAESCHKE, FARHOOD, SMITH, 1990; BREMER *et al.*, 1994; SHIRATORI *et al.*, 1994; FUKUMOTO, KURODA, SAITOH, 1995; HISAMA *et al.*, 1996; WANNER *et al.*, 1996).

As células de Kupffer são também fonte de mediadores gerados durante a isquemia/reperfusão (CLAVIEN *et al.*, 1992; BULKLEY, 1993; THURMAN, BUNZENDHAL, LEMASTERS, 1993; FUSAOKA *et al.*, 1994). Pode ocorrer aumento da adesividade leucocitária e plaquetária às células endoteliais e provocar um desequilíbrio no sistema de coagulação induzindo lesões sinusoidais mais intensas (STARZL & DEMETRIS, 1990; SUZUKI & TOLEDO-PEREIRA, 1993; OKANO *et al.*, 1996).

Os neutrófilos, quando aderidos às células endoteliais, têm papel importante (WELBOURN *et al.*, 1991; DEL MAESTRO, 1980) como liberadores de radicais livres de oxigênio (FULLER, GOWER, GREEN, 1988). Quando se induziu depleção leucocitária, KU *et al.* (1995) observaram elevados níveis enzimáticos séricos de AST, ALT e DHL durante a reperfusão, favorecendo a hipótese de que as células de Kupffer têm papel primordial na geração de radicais livres de oxigênio.

Adicionalmente, a ativação das células de Kupffer e dos neutrófilos podem levar à liberação de fator de necrose tumoral (SUZUKI & TOLEDO-PEREIRA, 1994), leucotrienos (HSUEH, GONZALEZ-CRUSSI, ARROYAVE, 1986; LEHR *et al.*, 1991), tromboxanas (WANNER *et al.*, 1996; YOKOYAMA *et al.*, 1996), prostaglandinas (SHINOHARA *et al.*, 1996), endotelinas e óxido nítrico (HYSLOP & DE NUCCI, 1992; ESTEBAN *et al.*, 1995; FARO *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1995), fator de ativação plaquetária (KUBES *et al.*, 1990a; FUKUOKA *et al.*, 1993a, 1993b; NISHIYAMA *et al.*, 1993), radicais livres de oxigênio (ATALLA *et al.*, 1985; NAUTA *et al.*, 1990; POST *et al.*, 1995), tais como ânion superóxido, peróxidos, e radicais oxidrila, que sendo instáveis reagem rapidamente (JAESCHKE & FARHOOD, 1991; BULKLEY, 1994; HAMER, WATTIAUX, WATTIAUX-DE- CONINCK, 1995).

O efeito citotóxico, com aumento do influxo de cálcio, pode causar danos à membrana celular, membrana mitocondrial (CASTILHO *et al.*, 1995; LUFT, 1995; RICHTER *et al.*, 1995; WILLET *et al.*, 1995) e superfície endotelial, levando a distúrbios na microcirculação e consequente hipotensão (AGGARWAL *et al.*, 1989; CALDWELL-KENKEL *et al.*, 1991; RAUEN *et al.*, 1993; SHIRATORI *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1995; MENDER, 1995).

A liberação de RLO e mediadores inflamatórios na isquemia/reperfusão pode ocorrer nos hepatócitos, nas células de Kupffer, nas células endoteliais e nos leucócitos, tais como fosfolipase A₂, fator de ativação plaquetária (PAF), eucosanóides, proteases e fator de necrose tumoral (BERNELLI-ZAZZERA *et al.*, 1992; CLAVIEN *et al.*, 1992; MATIM *et al.*, 1993; NISHIYAMA *et al.*, 1993; TAKADA *et al.*, 1995a).

As lesões tissulares derivadas da ação dos RLO podem ser expressas por alterações nas membranas celulares. O aumento das enzimas séricas como da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e desidrogenase láctica (DHL), podem refletir desordens estruturais e funcionais dos microsossomos hepáticos (SIMONDS, 1923; GORES *et al.*, 1988; REICHLING & KAPLAN, 1988; RADZIUK, 1990; SHERLOCK & DOOLEY, 1993). A dosagem da desidrogenase láctica por eletroforese determina qual das suas frações encontra-se aumentada. O aumento da fração 5 da DHL é um indicador específico e sensível do tecido hepático lesado (PAPADOPOULOS, 1977; REICHLING & KAPLAN, 1988; FERNANDES, 1993; CASTRO E SILVA *et al.*, 1996)

Na membrana interna da mitocôndria ocorre a fosforilação oxidativa e cerca de 90% do ATP produzido é utilizado para a atividade metabólica dos hepatócitos. A fosforilação oxidativa é composta por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia de transporte de elétrons (complexo I-IV) e FoF1-ATP sintetase (complexo 5), por uma série de reações de óxido-redução ligadas a NAD (dinucleotídeo de nicotinamida-adenina) e NADH desidrogenase mitocondrial. Um gradiente protônico é gerado e utilizado para a síntese de ATP (STRYER, 1992; KRÄHENBÜHL, 1993).

A isquemia/reperfusão causa danos estruturais e funcionais aos hepatócitos, tornando a mitocôndria uma fonte de geração de RLO podendo, assim, levar à perda da capacidade de compensação mitocondrial, dada a impossibilidade de restaurar a carga energética das células, ocasionando a morte celular (OZAWA *et al.*, 1966; FARBER, MARTIN, CHIEN, 1978; MITTNACHT & FARBER, 1981; FATH *et al.*, 1985; UYEMURA & CURTI, 1991; OZAWA, 1992; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1995; CASTRO E SILVA, Jr. *et al.*, 1996).

Usualmente quando o tecido hepático é submetido à isquemia ocorre diminuição da velocidade de consumo de oxigênio no estado III da respiração mitocondrial e aumento da velocidade de consumo de oxigênio no estado IV da respiração mitocondrial (FUJII, JOHNSON, GORES, 1994; SATOH *et al.*, 1994). A relação do estado III e estado IV fornece a razão de controle respiratório (RCR) que indica o grau de acoplamento mitocondrial (oxidação/fosforilação), isto é, há fluxo de elétrons e geração de energia; assim, quando há um dano mitocondrial causado pela isquemia, indica a ocorrência de vários níveis de desacoplamento mitocondrial (CHIEN & FARBER, 1977; INOUE & TAGAWA, 1993; SATOH *et al.*, 1994; JONES, 1995). Vários estudos em isquemia normotérmica relatam diminuição da função mitocondrial durante o período de isquemia (FARBER *et al.*, 1978; MITTNACHT & FARBER, 1981; GONZALEZ-FLECHA *et al.*, 1993).

A disfunção mitocondrial que ocorre nos hepatócitos e nas células de Kupffer é associada com a liberação de RLO, por perda da fosforilação oxidativa e depleção de ATP. As células liberam $O_2^\bullet$ pelo sistema NAD/NADH; o superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio gerando radicais hidroxilas, que sendo altamente instáveis reagem com os componentes lipídicos da membrana celular (SHIBUYA *et al.*, 1996).

A lipoperoxidação nas membranas biológicas é um processo destrutivo iniciado por radicais livres de oxigênio (KELLOGG & FRIDOVICH, 1975; LITTAUER & DE GROOT, 1992; DUTHIE, 1993; SUZUKI & TOLEDO-PEREYRA, 1993; CARACENI *et al.*, 1994; HAMER *et al.*, 1995) causando edema e aumento do influxo de cálcio (NEPOMUCENO *et al.*, 1991; REED & SAVAGE, 1995), com consequente disfunção mitocondrial pois, uma vez iniciada a condição de isquemia/reperfusão, os radicais H_2O_2 e $OH^\bullet$ podem abrir canais na membrana mitocondrial devido ao ataque a grupos sulfidríla (SH) de determinadas proteínas, expostas pela ligação de Ca^{++} . O aumento deste íon pode ativar a fosfolipase A_2 mitocondrial, induzindo maior formação de $OH^\bullet$. Os lipoperóxidos formados podem ser reduzidos por glutathione e alopurinol, vitamina E e α -tocoferol (MCCORD, 1985; KOBAYASHI *et al.*, 1992; DURMUS *et al.*, 1994).

A glutathione reduzida (GSH) é um antioxidante celular, metabolizado na célula pela glutathione peroxidase, que cataliza a conversão de peróxido de hidrogênio para oxigênio e água. Este sistema de redução pela GSH é um dos sistemas que a mitocôndria utiliza para manter-se estável. Durante processos isquêmicos e pós-reperfusionais ocorre perda da capacidade anti-oxidante mitocondrial e as células tornam-se mais sensíveis aos efeitos da excessiva produção de radicais livres de oxigênio, sendo estas alterações detectadas pelo aparecimento de produtos da lipoperoxidação como o malondialdeído (MDA) e diminuição do conteúdo hepático de GSH mitocondrial (BOUDJEMA *et al.*, 1990; LITTAUER & DE GROOT, 1992; KARWINSKI *et al.*, 1993b; LIU *et al.*, 1994; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1995; NARDO *et al.*, 1996).

Buscando minimizar estas alterações inflamatórias que ocorrem durante o binômio isquemia/reperfusão, vários agentes farmacológicos têm sido utilizados com o objetivo de diminuir as lesões de reperfusão que se instalam durante as cirurgias hepáticas eletivas, de urgência, ou mesmo nos transplantes hepáticos (HASSELGREN, 1987; GRACE, 1994).

A prostaciclina tem sido relacionada com a melhora das lesões ocorridas no tempo de isquemia (MONDEN & FORTNER, 1982; TOLEDO-PEREYRA, 1984; CRAFA *et al.*, 1991).

A clorpromazina tem sido relatada como inibidor do influxo do cálcio que pode ocorrer durante a reperfusão, inclusive protegendo a função mitocondrial (FARBER, CHIEN &

MITTNACHT, 1981; CHIEN *et al.*, 1977; SHIBAYAMA *et al.*, 1991). Os bloqueadores dos canais de cálcio como verapamil, diltiazem, e nimodipina têm sido utilizados contra as lesões ocorridas na isquemia e reperfusão (HUGHES *et al.*, 1986; KURITA *et al.*, 1993; CHAVEZ-CARTAYA *et al.*, 1996; KARWINSKI, GARCIA, HELTON, 1996).

A proteção contra as lesões de reperfusão mediadas pelos radicais livres de oxigênio e pela xantina oxidase tem sido relacionada ao uso de superóxido dismutase, catalase e alopurinol (ATALLA *et al.*, 1985; BAKER *et al.*, 1985; KOYAMA *et al.*, 1985; MAROTTO, THURMAN, LEMASTERS, 1988; NAUTA *et al.*, 1990; KARWISNKI *et al.*, 1991; CEJALVO *et al.*, 1993; FREDERIKS, KOOLJ, BOSCH, 1995).

O uso de inibidores das proteases (inibidor da tripsina urinária) têm sido utilizado por alguns autores como pré-tratamento das lesões de isquemia/reperfusão procurando inibir a liberação de proteases neutrofílicas (LI *et al.*, 1993).

O uso de outros tipos de agentes antioxidantes, inibidores de enzimas da cadeia respiratória, também tem sido relatado, tais como α -tocoferol (MARUBAYASHI *et al.*, 1986), coenzima Q10 (MARUBAYASHI *et al.*, 1982), inibidores da metilglutaril coenzima A (SATO *et al.*, 1994), e antioxidantes como a glutatona (HAMER *et al.*, 1995; MARUJO, 1995).

Alguns autores relataram efeitos benéficos de supressores diretos ou indiretos da atividade das células de Kupffer e dos neutrófilos, como a pentoxifilina e o cloreto de gadolínio (SHIRATORI *et al.*, 1994; SUZUKI & TOLEDO-PEREYRA, 1994; PENG *et al.*, 1995; HISAMA *et al.*, 1996; KOZAKI, MATSUNO, KOZAKI, 1996).

Os imunossupressores ciclosporina A e FK 506 têm sido relatados também como protetores da lesão de isquemia/reperfusão quando administrados antes da fase reperfusão (SAKR *et al.*, 1990; KUROKAWA *et al.*, 1992; SUZUKI, *et al.*, 1993; KAWANO *et al.*, 1994). Outros hepatoprotetores como os ácidos biliares têm sido usado como protetores das lesões pós-reperfusionais (CHAZOULLÈRES *et al.*, 1991).

1.2.1 Fator de Ativação Plaquetária (PAF)

Dentre os fatores endoteliais que interagem nas lesões que ocorrem na isquemia/reperfusão destacamos o PAF. Dos mediadores inflamatórios que interagem na síndrome de isquemia reperfusão, como relatado por AGGARWAL *et al.* em 1989, entre outras substâncias (tromboxana, prostaciclina, prostaglandinas, precalicreína, e leucotrienos) atua como uma substância vasoativa que causa vasodilatação e exerce efeitos sobre o tônus vascular e a pressão sanguínea.

O fator ativação plaquetária (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina, PAF) é um fosfolípido que possui potente atividade biológica. É um potente mediador celular envolvido em vários processos fisiopatológicos incluindo agregação plaquetária e ativação de neutrófilos. É secretado por monócitos, basófilos, neutrófilos, macrófagos, células de Kupffer, células endoteliais e sinusoidais. Pode ainda induzir hipotensão, leucopenia, trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular (STAFFORINI, MACINTYRE, PRESCOTT, 1990). Este fosfolípido, juntamente com os eucosanóides, contribuem para a regulação da interação entre as células sanguíneas e a resistência e permeabilidade vascular (BENVENISTE, HENSON, COCHRANE, 1972; HENSON, 1990; ZIMMERMAN *et al.* 1985, 1990).

O PAF é um fosfolípido liberado das células em resposta à estimulação de agonistas como trombina e pró-colágeno. De modo geral, a liberação do PAF é concomitante à liberação de ADP e metabólitos do ácido araquidônico como consequência da ativação das plaquetas. Dentre os processos patológicos nos quais o PAF está implicado citamos a gravidez, asma, inflamações, ulcerações gastrointestinais, endotoxemia, cirrose hepática, rejeição após transplantes, e lesões de isquemia/reperfusão (ROSAM, WALLACE, WHITTLE, 1986; LEWIS *et al.*, 1988; PIGNOL *et al.*, 1988; FLETCHER, DISIMONE, EARNEST, 1990; LAFFI *et al.*, 1993; MORENO *et al.*, 1993). Sua síntese tem sido descrita como iniciando-se a partir da ação da fosfolipase A₂ (GONZALEZ-CRUSSI & HSUEH, 1983; STAFFORINI *et al.*, 1990; ZIMMERMAN *et al.*, 1990). Sua ação é dose dependente e tem apresentado variações nas diferentes espécies estudadas (BRAQUET *et al.*, 1987; WALLACE, & MACNAUGHTON, 1988; HOURANI & CUSACK, 1991). Induz metabolismo fosfolipídico e mobilização intracelular de Ca⁺⁺ (McINTYRE & POLLOCK, 1983). Sua potente ação como agregante plaquetário está

relacionada à sua ação hipotensora e broncoconstritora, o que indica que receptores similares podem mediar estes efeitos (GODFROID *et al.*, 1987).

O *PAF* pode modular a integridade endotelial, levando ao aumento da permeabilidade vascular e edema (BRAQUET *et al.*, 1987). Células endoteliais de diferentes espécies e dos mais variados tipos de leitos vasculares rapidamente sintetizam *PAF*, desde que estimuladas em situações como inflamações, isquemia e reoxigenação. Nestas situações, o *PAF* interage com a superfície da célula endotelial e medeia a interação do endotélio com os neutrófilos. Nesse caso o *PAF* age como um agente quimiotático, aumentando a síntese de leucotrienos. Estas ações são rapidamente concluídas e ocorrem fisiologicamente, desde que o estímulo não se mantenha (BENVENISTE *et al.*, 1972; CAMUSSI *et al.*, 1981; ZIMMERMAN *et al.*, 1985; D'HUMIÈRES, RUSSO-MARIE, VARGAFTIG, 1986; BRAQUET, *et al.*, 1987; WALLACE & MACNAUGHTON, 1988; ONTELL *et al.*, 1989; HENSON, 1990; STAFFORINI *et al.*, 1990; ZIMMERMAN *et al.*, 1990; BAUTISTA & SPITZER, 1992),

Outras interações do *PAF* foram registradas como ativação de sua síntese na presença de H_2O_2 e sua capacidade de indução da adesão leucocitária junto às células endoteliais na vigência de processos inflamatórios (LEWIS *et al.*, 1988). Outro tipo de interação acontece com o NO (óxido nítrico). Dependendo da circunstância pode ter efeito vasoconstritor e causar aumento da glicogenólise em fígados isquêmicos (MOY, BATES, FISHER, 1991).

Em estudos realizados em cobaias, com perfusão cardíaca, a administração do *PAF* diminuiu o fluxo coronariano e a força contrátil do ventrículo esquerdo, sendo que estes efeitos não foram afetados pela indometacina. Isto indica que embora a ciclooxigenase e lipooxigenase possam ser ativadas pelo *PAF* (CHILTON *et al.*, 1982; LIN, MORTON, GORMAN, 1982), as mesmas não têm papel nos efeitos cardíacos mediados pelo *PAF*, ou seja, a inibição destes efeitos ocorre somente com seus antagonistas específicos.

Durante o período de isquemia, o *PAF* tecidual hepático é quase indetectável, mas após o primeiro minuto da reperfusão seus níveis aumentam significativamente (ZHOU *et al.*, 1992; FUKUOKA *et al.*, 1995).

Entre as drogas que apresentam ação como antagonista do *PAF* estão as triazolobenzodiazepinas (KORNECKI, EAHRlich, LENOX, 1984; HWANG *et al.*,

1986), alguns bloqueadores de canais de Na^+ , como a amilorida (HWANG, LAM, CHANG, 1986) e alguns bloqueadores de canais de Ca^{++} , incluindo diltiazem e verapamil (KORNECKI *et al.*, 1984; TUFFIN & WADE, 1985). Os antagonistas do *PAF* apresentam interação com os grupos sulfidrilas (SH), ainda não bem caracterizadas (HOURANI & CUSACK, 1991).

1.2.2 Antagonistas Específicos do Fator de Ativação Plaquetária (*PAF*)

Desde a descoberta do fator de ativação plaquetária (*PAF*) em 1972 por BENVENISTE *et al.*, pesquisam-se suas ações farmacológicas e fisiológicas, assim como as de seus antagonistas específicos. Estes vem sendo estudados desde a década passada, procurando-se adequadas aplicações terapêuticas por intermédio de estudos experimentais. Estudou-se o efeito preventivo sobre a nefrotoxicidade causada pela administração de ciclosporina (PIROTZKY *et al.*, 1988), a ação protetora contra as lesões de isquemia/reperfusão em transplantes de coração e pulmão (GAYUMI, JAMIESON, POOSTIZADEH, 1991; CONTE *et al.*, 1991), de rim (YIN *et al.*, 1995), de pâncreas (FELIP *et al.*, 1994) e de fígado (LIU *et al.*, 1990; TAKADA *et al.*, 1995b). Simultaneamente a estes estudos, vários autores têm procurado elucidar as alterações decorrentes da isquemia hepática normotérmica e a efetividade destes antagonistas.

1.2.2.1 WEB 2086

Entre os antagonistas, a droga *WEB 2086* pertencente ao grupo tienotriazolo-1-4-diazepinos (hetrazepinos), tem sido apontada como um antagonista específico do *PAF*. Esta droga desprovida de ação hipnótica e sedativa, tem boa diluição em água e solução salina, e é estável à luz, podendo ser estocada em temperatura ambiente. Recomenda-se sua utilização no mesmo dia da preparação, mantendo-se o pH menor que 5,5 para que não ocorra diminuição de sua atividade. Tem sido utilizada para avaliação da inibição "in vivo" da atividade hipotensora do fator de ativação plaquetária (*PAF*) em modelos experimentais (BRAQUET *et al.*, 1987).

A meia vida biológica em ratos é de três horas quando administrada por via oral e de 80 a 300 minutos quando administrada por via venosa. A dose usualmente recomendada é de 1 a 20 mg/kg de peso corpóreo. Deve ser administrada pelo menos cinco minutos

antes da administração do fator de ativação plaquetária (*PAF*) ou de sua suposta liberação por plaquetas, neutrófilos, macrófagos ou em estados isquêmicos. As doses para inibição do *PAF* endógeno em geral são maiores que as utilizadas para inibição do *PAF* aplicado de maneira exógena (CASALS-STENZEL & HEUER, 1990).

O *WEB 2086* tem sido utilizado experimentalmente em ratos e camundongos com bons resultados em estudos sobre o choque endotóxico, porém a dose ideal para inibição do *PAF* endógeno ainda é desconhecida. *WEB 2086* é tido como um potente e seletivo antagonista do *PAF*, quando utilizado "in vivo", com longa duração de ação para ser empregado no estudo da fisiopatologia de diferentes doenças que apresentem liberação do *PAF*, como ocorre na isquemia hepática (HWANG *et al.*, 1986; CASALS-STENZEL & HEUER, 1990).

1.2.2.2 Outros antagonistas específicos do *PAF*

Vários autores têm estudado outros tipos de antagonistas específicos do *PAF*, também relatados como atuantes na proteção das alterações da isquemia/reperfusão (SRI 63-441, SDZ 63 441; CV 6209, E 5880, TCV 309, BN 52021, BN 52022, e WEB 2170). São substâncias utilizadas momentos antes do início da isquemia ou adicionadas antes do início da reperfusão, por via oral, intraperitoneal ou endovenosa, sendo relatados efeitos protetores em relação à função mitocondrial, hipotensão, lipoperoxidação, diminuição de liberação de RLO e manutenção da morfologia celular à microscopia óptica ou eletrônica (ONTELL *et al.* 1989; ZHOU *et al.*, 1992; TAKADA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1993; BOROBIA *et al.*, 1993; FUKUOKA *et al.*, 1993a; MINOR & ISSELHARD, 1993; LIU *et al.*, 1994; MINOR, YAMAGUCHI & ISSELHARD, 1995a; SPIEGEL *et al.*, 1995; TAKADA *et al.*, 1995a;). Há porém controvérsias quanto ao seu efeito como protetor celular hepático, talvez por ser dose-dependente, já que estudos mostram valores elevados de enzimas hepáticas após a reperfusão (ONTELL *et al.* 1989; CHAVEZ-CARTAYA *et al.*, 1994; BOIN *et al.*, 1996).

1.2.2.3 SRI 63441

Um dos primeiros estudos sobre a ação protetora dos antagonistas do *PAF* nas lesões da isquemia/reperfusão foi realizado por ONTELL *et al.* (1989) utilizando o antagonista

SRI 63 441 em animais submetidos a isquemia hepática total durante 90 minutos e 90 minutos de reperfusão (através de bomba e perfusão isolada). Observaram que em animais pré-tratados houve aumento da produção de bile, do conteúdo tissular de ATP e diminuição dos níveis de aminotransferases em relação aos controles isquêmicos, dependendo da dose de SRI 63441 utilizada. A utilização de superóxido dismutase (SOD) como sequestrador de radicais livres de oxigênio diminuiu, após a reperfusão, as aminotransferases e ocasionou maior produção de bile. O ibuprofen, usado como inibidor da ciclooxigenase, não apresentou diferença na função hepática em relação aos grupos isquêmicos controle. Em todos os grupos estudados observou-se vacuolização citoplasmática.

1.2.2.4 CV 6209

Outro antagonista estudado por vários autores é o CV 6209. Em 1992, FUKUOKA *et al.* demonstraram a ocorrência da depressão circulatória sistêmica que ocorre após a indução de isquemia hepática seletiva durante 60 minutos. Observaram inibição da hipotensão, mas a pressão venosa central e as aminotransferases não apresentaram diferença em relação aos grupos controle.

Neste mesmo ano (1992), TAKADA *et al.* relataram que o uso deste antagonista em coelhos, após isquemia hepática total de 30 minutos e uma hora de reperfusão, melhorou a carga energética hepática por aumentar o índice de corpos cetônicos arterial, sem apresentar diferenças em relação as transaminases e desidrogenase láctica.

Em 1993, WANG *et al.*, utilizando este mesmo antagonista em animais submetidos a isquemia hepática seletiva de até 90 minutos e 120 minutos de reperfusão, relataram aumento do fluxo biliar e dos níveis teciduais de ATP, sendo que as alterações enzimáticas foram dependentes da dose de CV6209. Quando foram usadas altas doses houve aumento das aminotransferases em relação ao grupo controle.

Neste mesmo ano, FUKUOKA *et al.* (1993a) relataram que o *PAF* mediava a hipotensão ocorrida após isquemia hepática total (45 minutos) e 30 minutos de reperfusão, com altos níveis de *PAF* após a indução da isquemia. Usando CV 6209 inibiram a hipotensão e melhoraram os índices de sobrevivência, mas a pressão portal manteve-se alta durante a isquemia e diminuiu em ambos os grupos após a reperfusão.

1.2.2.5 WEB 2170

ZHOU *et al.* (1992) demonstraram que a inibição das células de Kupffer, com cloreto de gadolínio, e a inibição de liberação de radicais livres de oxigênio, pelo alopurinol, reduziu a síntese do *PAF* no fígado, principalmente na fase mais tardia da reperfusão (após a 12ª hora). O uso do WEB2170 (antagonista específico do *PAF*) atenuou a necrose hepática e a infiltração neutrofílica, reduzindo os níveis de alanina aminotransferase.

Em 1994, LIU *et al.* submeteram animais à isquemia hepática total durante 90 minutos. Verificaram, com fluxometria a laser com Doppler, que o grupo pré-tratado com WEB 2170 obteve melhor índice de sobrevivência, melhor índice de reperfusão hepática e menor desarranjo ultraestrutural em relação aos controles, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando as doses de WEB foram administradas antes, durante e após a reperfusão. Neste mesmo ano, CHAVEZ-CARTAYA *et al.* relataram que o uso deste antagonista em animais submetidos a 45 minutos de isquemia e posterior reperfusão não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle no tocante à recuperação do fluxo hepático pós-isquemia e saturação da oxihemoglobina no fígado.

SPIEGEL *et al.* (1995) realizaram transplante hepático em porcos e relataram que o uso contínuo do WEB 2170, nas primeiras seis horas após a reperfusão, diminuiu a adesão leucocitária e melhorou a perfusão sinusoidal e a microcirculação, via interação dos mediadores da adesividade leucocitária (seletina, *PAF*, ICAM-1, e ICAM-2).

1.2.2.6 BN 52021 e 52022

Em 1993, MINOR & ISSELHARD relataram que o uso do BN52021 reduziu a lipoperoxidação, e os níveis de ALT e aumentou a produção hepática de ATP e do fluxo biliar, dos animais submetidos a 60 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão.

Também em 1993, BOROBIA *et al.* verificaram que o uso deste antagonista do *PAF* melhorou a sobrevivência, diminuiu a necrose hepática e não apresentou diferenças nas dosagens de aminotransferases dos animais pré-tratados na indução da isquemia hepática seletiva de 75 minutos. Estes parâmetros foram avaliados após 24 horas de reperfusão.

MINOR *et al.* (1995a) observaram que houve aumento da produção de ATP, diminuição das aminotransferases, da atividade de fosforilases purínicas (PNP), aumento na produção de bile, e melhora do fluxo hepático após o pré-tratamento com BN 52021, em ratos submetidos a isquemia hepática seletiva normotérmica. Neste mesmo ano, MINOR, ISSELHARD, YAMAGUCHI, (1995b) relataram o uso deste antagonista em transplante de fígado de ratos e observaram que houve acentuada redução dos níveis de desidrogenase láctica, aumento na produção de bile e diminuição da atividade da enzima mieloperoxidase. Concluíram que o BN 52021 foi capaz de reduzir as alterações que ocorreram após a reperfusão do fígado hipotérmico.

1.2.2.7 TCV 309

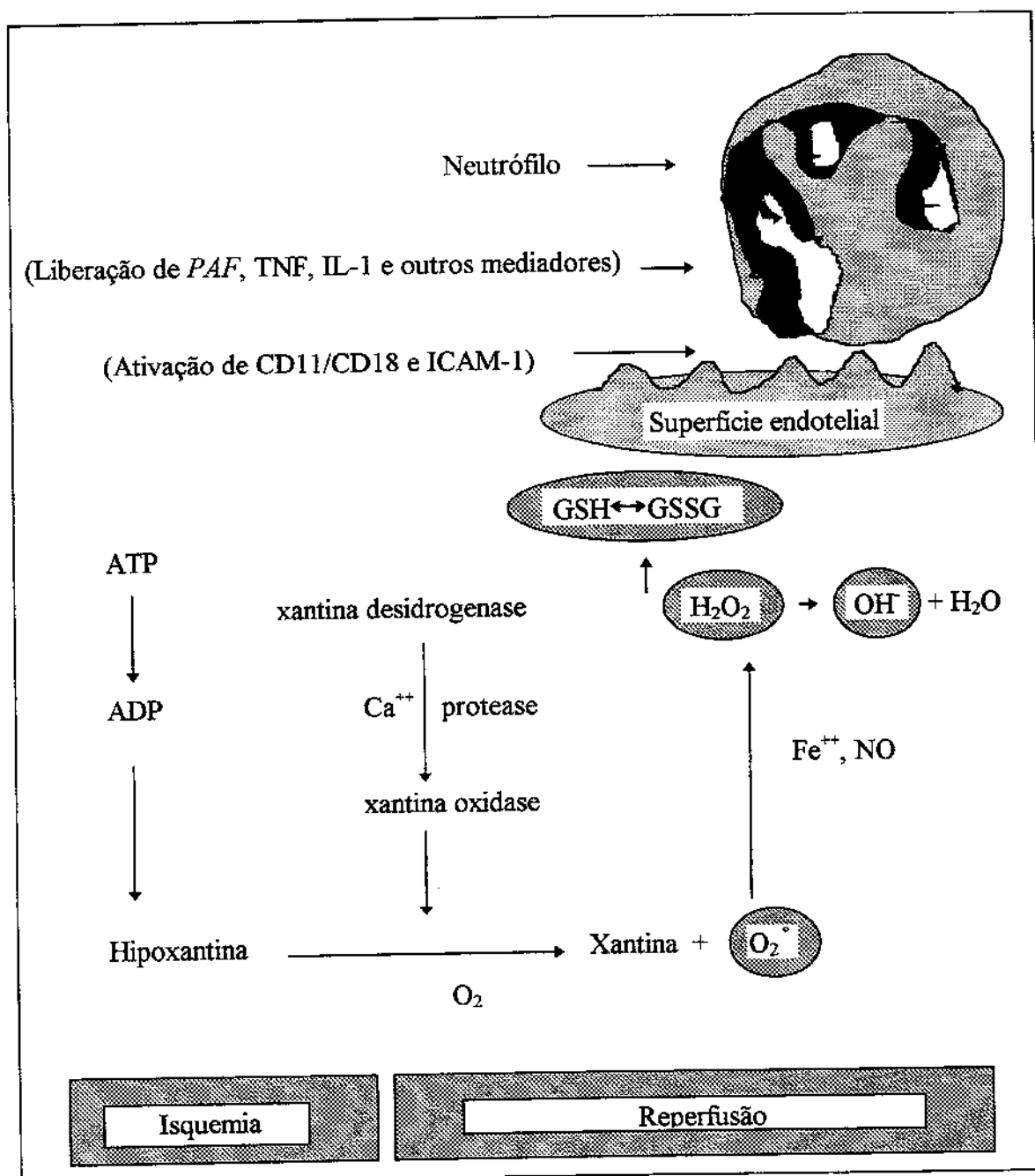
Um outro antagonista do *PAF* é o TCV 309. Tem sido usado por vários autores em experimentos que induzem isquemia/reperfusão. NISHIYAMA *et al.* (1993) estudaram seus efeitos como inibidor das lesões oxidativas em animais submetidos a isquemia hepática normotérmica (60 ou 90 minutos) e 60 minutos de reperfusão. Os grupos submetidos à associação com um análogo da PGI_2 apresentaram maior índice de sobrevivência após 30 dias do experimento.

FUKUOKA *et al.* (1993b; 1995) relataram que os animais submetidos a isquemia hepática seletiva de 90 minutos apresentaram aumento na concentração plasmática de *PAF*, e o efeito hipotensor foi inibido com TCV 309. Observaram concomitante aumento de tromboxana B_2 e de $PGF1-\alpha$, indicando interação, em cascata, do ácido araquidônico e liberação de *PAF* na vigência de isquemia.

1.2.2.8 E 5880

O uso deste antagonista é mais recente. Foi utilizado em transplante hepático em porcos, adicionando-se E 5880 à solução de preservação (Wisconsin). Mostrou ter efeito protetor porque melhorou a sobrevivência, diminuiu a infiltração leucocitária nos espaços portais, provavelmente por ter diminuído a adesividade dos neutrófilos às células sinusoidais, apesar de apresentar menor índice arterial de corpos cetônicos (TAKADA *et al.*, 1995a, 1995b).

O interesse em estudar a ação do antagonista *WEB 2086* advém da possível inibição que este possa efetuar sobre as alterações que ocorrem durante a isquemia/reperfusão hepática normotérmica.



Quadro 1- Esquema hipotético dos mecanismos de liberação do *PAF*.

A depleção de adenosina tri e difosfato (ATP e ADP) para hipoxantina e xantina por ação da reoxigenação, na presença de xantina oxidase, sob ação de cálcio (Ca⁺⁺), proteases, Ferro (Fe⁺⁺), e nitrito (NO) estimula a liberação do fator de ativação plaquetária (*PAF*), fator de necrose tumoral (TNF), citocinas, e radicais livres após a isquemia/reperfusão. Ocorre ativação de glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG) por interação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este esquema foi compilado segundo o relato de vários autores (ATALLA *et al.*, 1985; WARD, 1991; BULKLEY, 1994).

MÉTODO

2. MÉTODO

2.1 ANIMAIS ESTUDADOS

Foram estudados 240 ratos machos, sadios, da linhagem Wistar, com peso corporal entre 270 e 330 gramas. Destes, 192 foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), nos quais realizaram-se as avaliações da bioquímica do sangue, da função mitocondrial hepática, da lipoperoxidação do conteúdo hepático e análise histológica hepática. Outros 48 ratos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com as mesmas características, nos quais foi realizada a avaliação hemodinâmica.

2.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS

O esquema de planejamento experimental para a formação dos grupos e o esquema gráfico dos diversos tempos do estudo encontram-se, respectivamente, nos Quadros 2 e 3.

Para a realização da avaliação bioquímica sérica, tecidual e análise histológica, os animais foram divididos em dois grupos com 96 ratos cada:

Grupo A - cinco minutos antes do início da isquemia hepática seletiva foi administrado 0,5 ml de soro fisiológico 0,9%, por punção da veia caudal.

Grupo B - cinco minutos antes do início da isquemia hepática seletiva foi administrada a droga *WEB 2086*, na dose de 10 mg/kg de peso corpóreo, diluídos em 0,5 ml de soro fisiológico 0,9%, por punção da veia caudal.

Os animais foram distribuídos em oito subgrupos de 24 ratos, descritos a seguir.

2.2.1 Grupo A

- A1 - os animais deste subgrupo tiveram os ligamentos hepáticos liberados, porém não foram submetidos à isquemia durante os 60 minutos de estudo.

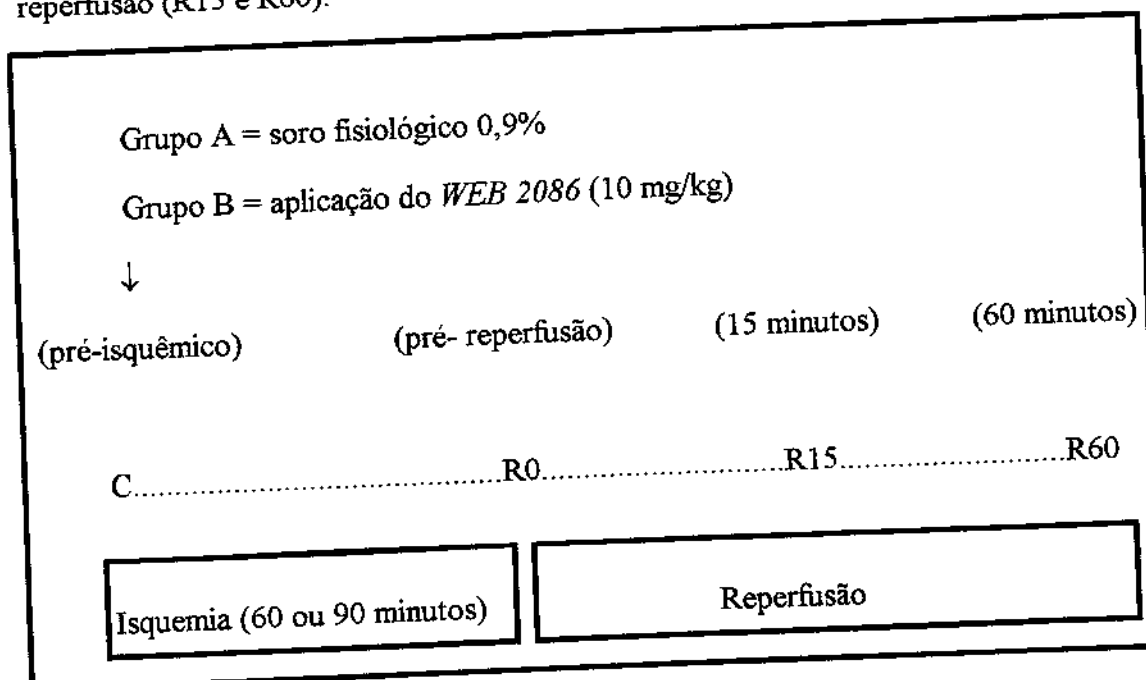
Quadro 2 - Esquema de planejamento experimental

Formação dos grupos de estudo, conforme a distribuição dos animais nos grupos A (soro fisiológico) ou B (*WEB 2086*), segundo o tempo de isquemia proposto (60 ou 90 minutos), nos períodos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) ou após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

Grupo	Isquemia (minutos)	Subgrupo	Tempo de Isquemia / Reperfusão			
			C	R0	R15	R60
A	60 (controle)	A1				
A	60 (isquemia)	A2				
A	90 (controle)	A3				
A	90 (isquemia)	A4				
B	60 (controle)	B1				
B	60 (isquemia)	B2				
B	90 (controle)	B3				
B	90 (isquemia)	B4				

Quadro 3 - Esquema de administração do *WEB 2086*

Esquema de administração de soro fisiológico no grupo A e *WEB 2086* no grupo B, no período pré-isquêmico C. A reperfusão (R0) iniciou-se após 60 ou 90 minutos de isquemia. Estudos adicionais foram realizados após 15 minutos e 60 minutos do início da reperfusão (R15 e R60).



- A2 - os animais deste subgrupo foram submetidos a 60 minutos de isquemia hepática seletiva, através do pinçamento do pedículo vascular hepático esquerdo, levando à oclusão temporária da tríade portal esquerda, com consequente isquemia dos lobos hepáticos esquerdo e mediano.
- A3 - os animais deste subgrupo tiveram os ligamentos hepáticos liberados, porém não foram submetidos à isquemia durante os 90 minutos de estudo.
- A4 - os animais deste subgrupo foram submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva, através do pinçamento do pedículo vascular hepático esquerdo, levando à oclusão temporária da tríade portal esquerda, com consequente isquemia dos lobos hepáticos esquerdo e mediano.

2.2.2 Grupo B

- B1 - os animais deste subgrupo tiveram os ligamentos hepáticos liberados, porém não foram submetidos à isquemia durante os 60 minutos de estudo.
- B2 - estes animais foram submetidos ao pinçamento do pedículo vascular hepático esquerdo, causando oclusão temporária da tríade portal esquerda durante 60 minutos e consequente isquemia hepática seletiva dos lobos hepáticos esquerdo e mediano.
- B3 - os animais deste subgrupo tiveram os ligamentos hepáticos liberados, porém não foram submetidos à isquemia durante os 90 minutos de estudo.
- B4 - os animais deste subgrupo foram submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva, através do pinçamento do pedículo vascular hepático esquerdo, levando à oclusão temporária da tríade portal esquerda, com consequente isquemia dos lobos hepáticos esquerdo e mediano.

Após o término do tempo de isquemia, de 60 ou de 90 minutos, os animais foram submetidos à retirada da pinça vascular da tríade portal esquerda, com liberação do fluxo sanguíneo para os lobos hepáticos esquerdo e mediano, estabelecendo o período de reperfusão.

Cada subgrupo, formado por 24 animais, foi distribuído em subgrupos de seis ratos, nos quatro tempos descritos abaixo:

- pré-isquêmico = C; assim que se obteve liberação dos lobos hepáticos esquerdo e mediano.
- pré-reperfusão = R0; ao término do período correspondente à isquemia dos lobos hepáticos esquerdo e mediano (60 ou 90 minutos, dependendo do subgrupo estudado).
- após 15 minutos de reperfusão = R15; decorridos 15 minutos da retirada da pinça vascular do pedículo vascular hepático esquerdo.
- após 60 minutos de reperfusão = R60; decorridos 60 minutos da retirada da pinça vascular do pedículo vascular hepático esquerdo.

Ao término dos tempos C, R0, R15, e R60 foram coletados 2 ml de sangue da veia cava inferior para a realização da avaliação bioquímica. Os lobos esquerdo e mediano foram retirados para a realização da avaliação da função mitocondrial, da lipoperoxidação e da análise histológica.

2.3 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

Os animais foram operados em ambiente limpo, porém não asséptico, no Núcleo de Pesquisa em Hepatologia Cirúrgica do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), onde foram realizadas as avaliações bioquímicas sérica e avaliação da função mitocondrial.

2.3.1 Técnica Anestésica

Os animais foram deixados em jejum por período de 12 horas antes da operação, com água "ad libitum". Os ratos foram pesados e anestesiados com pentobarbital sódico (Sagatal - May & Baker / UK), na dose de 30 mg/kg de peso corpóreo, por punção da veia caudal. Quando necessário, injeções adicionais, correspondendo a um terço da dose

inicial, foram ministradas para manutenção do ato anestésico. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea.

Após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal horizontal, em pequenas mesas de madeira apropriadas para estes animais e fixados com tiras de esparadrapo nas patas. Foi feita a rapagem dos pelos na região abdominal anterior com tosquiadeira Oster Golden A5 - Modelo 5-55J (Wisconsin/USA) e foi realizada antissepsia com álcool iodado a 2%.

2.3.2 Técnica Operatória

Cinco minutos antes da laparotomia, foi administrada heparina sódica (Roche/SP) 100 UI/kg de peso corpóreo, pela veia caudal.

Procedeu-se à abertura da parede abdominal por planos, por incisão com bisturi frio, na linha mediana do apêndice xifóide até a cicatriz umbilical. Após a laparotomia, foi administrado, pela veia caudal, 0,5 ml de soro fisiológico a 0,9% (Grupo A) ou 0,5 ml de soro fisiológico a 0,9%, contendo *WEB 2086* (Smith-Kline - Beecham / UK) na dose de 10 mg/kg de peso corpóreo (Grupo B).

Identificados os lobos do fígado, procedeu-se à liberação dos lobos mediano e esquerdo por divulsão dos ligamentos hepáticos, com cotonete de algodão.

No tempo pré-isquêmico, nos subgrupos de estudo do tempo C, foram colhidos 2 ml de sangue por punção da veia cava inferior, para realização das dosagens bioquímicas. A seguir, os lobos hepáticos esquerdo e mediano foram retirados para avaliação da função mitocondrial, da lipoperoxidação e para análise histológica.

Decorridos cinco minutos da administração do *WEB 2086*, colocou-se, com o auxílio de uma pinça aplicadora (DBGM-FD 513, Aesculap / Alemanha), uma pinça vascular utilizada em neurocirurgia vascular (Yasargil FE-751, Aesculap / Alemanha) no pedículo vascular hepático esquerdo, para ocluir a artéria hepática esquerda, o ramo portal esquerdo e o ducto biliar esquerdo, com consequente isquemia dos lobos hepáticos mediano e esquerdo. Evitou-se, assim, a presença de congestão esplâncnica que resultaria da oclusão da veia porta (MARUBAYASHI *et al.*, 1986). Após o término do tempo de isquemia R0 (60 ou 90 minutos, conforme o subgrupo estudado), realizou-se a

coleta de 2 ml sangue por punção da veia cava inferior para realização das dosagens bioquímicas. A seguir, os lobos hepáticos esquerdo e mediano foram retirados para avaliação da função mitocondrial, da lipoperoxidação e para análise histológica.

Decorrido o tempo de isquemia proposto (ou o tempo anestésico correspondente), retirou-se a pinça vascular e iniciou-se a reperfusão dos lobos isquemiados. Nos subgrupos controle, efetuou-se manipulação com cotonete de algodão no hilo hepático. Após 15 minutos do início da reperfusão (R15), procedeu-se à coleta de 2 ml de sangue por punção da veia cava inferior, para a realização dos exames bioquímicos e a retirada dos lobos isquemiados para avaliação da função mitocondrial, da lipoperoxidação e para análise histológica.

Após 60 minutos do início da reperfusão (R60), foi coletado 2 ml de sangue por punção da veia cava inferior para a realização dos exames bioquímicos, e retirou-se os lobos hepáticos esquerdo e mediano para a realização do estudo da função mitocondrial, da lipoperoxidação e da análise histológica.

Após a retirada dos lobos isquemiados, os animais foram sacrificados com solução anestésica até que ocorresse a parada cardíaco-respiratória.

2.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE

A avaliação bioquímica sérica foi realizada através de dosagens da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fração 5 da desidrogenase láctica.

2.4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)

Foi determinada pelo método cinético (HENRY *et al.*, 1960), otimizado pelo laboratório Labtest Sistemas Diagnósticos Ltda., expressa em UI/L.

2.4.2 Alanina-Aminotransferase (ALT)

Foi determinada pelo método cinético (HENRY *et al.*, 1960), otimizado pelo laboratório Labtest Sistemas Diagnósticos Ltda., expressa em UI/L.

2.4.3 Fração 5 da Desidrogenase Láctica (DHL₅)

A dosagem da fração 5 da desidrogenase láctica foi obtida pelo método da eletroforese, utilizando-se membranas de acetato celulose para separação das isoenzimas (BEALS *et al.*, 1969). A leitura foi feita no densitômetro CELM - São Paulo / SP, expressa em UI/L.

2.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA TECIDUAL HEPÁTICA

2.5.1 Avaliação da Função Mitocondrial

Para o estudo da função mitocondrial foi utilizado tecido hepático obtido dos lobos isquemiados (esquerdo e mediano), durante os diversos períodos do experimento C, R0, R15, e R60.

2.5.1.1 Preparação das Mitocôndrias

Os lobos hepáticos obtidos foram imediatamente colocados em um recipiente contendo solução fisiológica gelada (temperatura entre 0 e 4° C), e acondicionados em caixa de isopor com gelo picado para conservar a temperatura. Foram cortados em pequenos fragmentos; um destes foi utilizado para análise histológica e os outros foram transferidos para outro recipiente com solução fisiológica gelada para retirada de coágulos e sangue dos fragmentos teciduais. A seguir, os fragmentos foram colocados em meio de homogeneização (sacarose 0,25 M, EDTA 1 mM e albumina 1 mg/ml, pH 7,4 ajustado com KOH). Foram continuamente cortados até obter-se fragmentos de dois por dois milímetros, aproximadamente. Foram homogeneizados utilizando-se o homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, em três ciclos de aproximadamente três segundos de duração, com intervalo de um minuto entre eles.

Para isolamento da fração mitocondrial do homogeneizado utilizou-se a técnica de centrifugação diferencial (PEDERSEN *et al.*, 1978). O homogeneizado obtido foi centrifugado (centrífuga refrigerada Hitachi Himac CR 21 / Japão) a 1080 g; o sobrenadante resultante foi centrifugado a 7690 g, ambos por dez minutos. O sedimento foi suspenso utilizando-se "dedo de gelo", conduzido ao volume inicial com meio de isolamento (sacarose 0,25 M; EDTA 1 mM; pH 7,4) e novamente centrifugado a 9000 g

por dez minutos (HOGEBOM *et al.*, 1948). Durante todo o procedimento, os tubos foram mantidos acondicionados em gelo picado, mantendo-se a temperatura entre 0 e 4° C; os estudos da função mitocondrial foram realizados dentro de um período máximo de duas horas. Da suspensão final foram obtidas amostras para determinação da atividade respiratória da fração mitocondrial e determinação da lipoperoxidação da fração mitocondrial.

2.5.1.2 Determinação da concentração de proteína mitocondrial

A determinação da concentração de proteína mitocondrial foi realizada pela técnica de HARTREE (1972).

2.5.1.3 Determinação do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi determinado por um polarógrafo-oxígrafo K-IC (Gilson Medical Electronics INC/USA), a 30° C, acoplado a um eletrodo de Clark (CHANCE & WILLIAMS, 1956; CHANCE, 1959; CASTRO E SILVA JR., 1986). O meio de respiração (1,4 ml) foi composto por sacarose 0,25 M; fosfato de potássio 8,5 mM; EDTA 1mM; albumina 0,14 mg/ml e Tris-HCL 10 mM, pH 7,4. Foram utilizadas 2,5 mg de proteína mitocondrial. O estado III, ativado, da respiração mitocondrial foi obtido pela adição de 400 nmol de MgADP às mitocôndrias energizadas, em relação ao substrato succinato. A relação entre a velocidade de respiração após a adição do ADP (estado III da respiração) e a velocidade do estado basal (estado IV da respiração) obtida após o consumo de ADP, forneceu a razão do controle respiratório (RCR). Os resultados obtidos com a avaliação da função mitocondrial foram expressos na unidade $\mu\text{M de O}_2 / \text{min.mg.proteína. } 10^{-3}$.

Os substratos ácido succínico e adenosina 5'-difosfato foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Os demais reagentes utilizados foram da marca Merck Sharp & Dohme.

2.5.2 Avaliação da Lipoperoxidação Mitocondrial

As amostras da fração mitocondrial foram congeladas a -70° C e enviadas ao Laboratório de Análises da Disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), para a determinação dos

indicadores da lipoperoxidação das mitocôndrias (glutathiona mitocondrial hepática e malondialdeído).

2.5.2.1 Determinação do conteúdo hepático de malondialdeído (MDA)

Na amostra da fração mitocondrial diluiu-se KCL 1,15%, de modo a obter-se 10 mg de proteína/ml da suspensão. Adicionou-se, a 0,1 ml desta suspensão, 0,2 ml de dodecil-sulfato de sódio (SDS); 1,5 ml de ácido acético a 20% (pH 3,5); e 0,1 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,8%) e água, até obter-se um volume final de 4,0 ml. Esta mistura foi então submetida à temperatura de 95° C durante 60 minutos. O recipiente contendo a solução foi resfriado em água corrente e adicionou-se 1 ml de água destilada e 5 ml de n-butanol. O tubo de ensaio com a solução obtida foi colocado em um agitador de Phoenix por 20 minutos. A seguir, foi centrifugado a 3500 g durante dez minutos. A absorbância da fase orgânica foi determinada com 532 nm. A concentração de MDA foi calculada a partir de uma curva de calibração, obtida tratando-se o 1,1,3,3-tetrametoxiproprano (TMP), de acordo com o procedimento acima descrito. A unidade de concentração do MDA foi descrita em nmol/mg de proteína (OHKAWA, OHISHI & YAGI, 1979). Os reagentes SDS, EDTA, KCl, ácido acético e ácido tricloroacético foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Os demais reagentes foram adquiridos da marca Merck Sharp & Dohme.

2.5.2.2 Determinação do conteúdo hepático de glutathiona reduzida (GSH)

Diluiu-se 0,1 ml da fração mitocondrial em 1,9 ml de KCL a 1,15%, de modo a se obter 1 a 2 mg de proteína/ml. Colocou-se 0,2 ml de ácido tricloroacético (1 g/ml), agitou-se e centrifugou-se a 3500 g durante dez minutos. Juntou-se 1,0 ml do sobrenadante a 2,0 ml da solução tampão (Tris-HCL 400 mM, 20 mM de EDTA com pH ajustado para 8,9) e 0,1 ml de DTNB (ditionitrobenzeno 10 mM em metanol) e agitou-se. A absorbância foi determinada após cinco minutos a 412 nm. A unidade de concentração de glutathiona obtida foi descrita em nmol/mg de proteína (SEDLAK & LINDSAY, 1968).

2.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. A leitura das lâminas foi realizada por um único patologista, em estudo cego.

Os lobos hepáticos isquemiados esquerdo e mediano foram retirados após os diversos períodos do experimento C, R0, R15 e R60. Foram acondicionados em solução fisiológica gelada, imediatamente cortados em pequenos fragmentos e um dos fragmentos foi escolhido aleatoriamente para a realização da análise histológica. O fragmento hepático selecionado foi imediatamente fixado em formalina a 10%, incluído em parafina, cortado e corado com Hematoxilina-Eosina (HE). A análise constou da avaliação da existência de congestão, vacuolização citoplasmática, necrose e infiltrado inflamatório (polimorfonucleares neutrófilos) portal e ou lobular. O grau de acometimento foi classificado como ausente, leve, moderado ou severo, para cada parâmetro estudado.

2.7 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

A avaliação hemodinâmica foi realizada em 48 ratos, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental nos Laboratórios de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, e da Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram pesados e anestesiados, por punção da veia caudal, com pentobarbital sódico (Sagatal - May & Baker / UK), na dose de 30 mg/kg de peso corpóreo. A manutenção anestésica foi descrita anteriormente.

Para o estudo hemodinâmico, foi realizada a cateterização da veia jugular direita com cateter de polietileno PE-90, posicionado no átrio direito para monitorização contínua da pressão venosa central (PVC). A seguir cateterizou-se a artéria carótida direita, com cateter de polietileno PE-50 para monitorização contínua da pressão arterial média (PAM). As medidas pressóricas foram realizadas de modo contínuo em um aparelho de oito canais (Mingograf- 804 / Siemens / USA).

Foi administrada heparina sódica (Roche / SP) 100 UI/kg de peso corpóreo, pela veia caudal e cinco minutos depois procedeu-se à abertura do abdome por incisão mediana, por planos. Cinco minutos antes de iniciar-se o tempo correspondente à isquemia hepática seletiva, administrou-se 0,5 ml de soro fisiológico 0,9% para os animais do grupo A, pela veia caudal, ou soro fisiológico 0,9% contendo *WEB 2086* (Smith-Kline-Beecham/UK), na dose de 10 mg/kg de peso corpóreo, para os animais do grupo B. O fígado foi então liberado como descrito anteriormente. Procedeu-se à leitura das pressões venosa central e arterial neste tempo pré-isquêmico (C).

Nos grupos isquêmicos realizou-se o pinçamento do pedículo vascular hepático esquerdo, da maneira descrita anteriormente. Ao final do tempo de isquemia (60 ou 90 minutos, dependendo do subgrupo em estudo), foram realizadas as medidas pressóricas, caracterizando o período R0.

Após este período, realizou-se a retirada da pinça vascular do pedículo vascular hepático, iniciando a reperfusão dos lobos hepáticos isquemiados. Ao final de 15 minutos de reperfusão, foi realizada nova leitura das medidas da pressão arterial média e da pressão venosa central, caracterizando o período R15.

Ao final de 60 minutos de reperfusão foi realizada nova leitura das pressões arterial e venosa central, caracterizando o período R60.

Após este período, os animais foram sacrificados com administração de solução anestésica até a ocorrência da parada cardíaco-respiratória.

Observe-se que, nesta parte do estudo, as medidas das pressões foram realizadas nos mesmos ratos durante os tempos C, R0, R15 e R60.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o programa *STATISTICA* para Windows, versão 5.1D (STATSOFT, INC. 1996), para a elaboração de gráficos e análises estatísticas. O nível de significância adotado foi $p=0,05$.

Com exceção das variáveis cujos valores são categorizados, usou-se a análise de variância - ANOVA - para avaliar o efeito da droga nas várias condições e tempos do

experimento, bem como suas interações. Testou-se a validade das hipóteses necessárias à aplicação da ANOVA para todas as variáveis em que foi empregada. Para as variáveis que não atenderam à essas condições, aplicou-se uma transformação de acordo com o método de Box-Cox (BOX & COX, 1964; BOX, HUNTER, HUNTER, 1978),

Nos casos em que a ANOVA indicou a existência de efeitos ou interações significativas, procedeu-se a comparações múltiplas entre médias, duas a duas, através do procedimento T de Tukey, também conhecido como teste HSD ("Honestly Significant Difference") (BOX, et al, 1978; DOWDY & WEARDEN 1985). As comparações múltiplas são visualizadas através de gráficos de interferência (HOAGLIN, MOSTELLER, TUKEY, 1991). Estes gráficos mostram as médias cercadas por um intervalo igual ao intervalo HSD determinado no procedimento T de Tukey (média $\pm$ HSD/2). Os intervalos que não apresentam sobreposição correspondem, portanto, a médias que distam entre si por um valor maior que HSD, ou seja, médias que são significativamente diferentes. O gráfico de interferência permite a visualização de um grande número de comparações de forma compacta.

Para as variáveis em que medidas foram feitas nos mesmos ratos, em diferentes tempos, usou-se a análise de variância para medidas repetidas. Estas variáveis foram PAM e PVC. Variáveis em que se aplicou a ANOVA: AST, ALT, DHL_s, GSH, MAD, EIII, EIV, e RCR. Nas variáveis AST, ALT, DHL_s, EIII, EIV e RCR usou-se uma transformação de Box-Cox.

As variáveis congestão, vacuolização citoplasmática, presença de polimorfo nucleares e necrose, que têm valores categorizados, foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que o teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças significativas, aplicou-se o teste de Mann-Whitney e a desigualdade de Bonferroni. Definiu-se um conjunto de oito comparações (A2 vs A4, B2 vs B4, A2 vs B2, A4 vs B4, A1 vs A2, B1 vs B2, B3 vs B4, A3 vs A4) e o nível de significância foi ajustado para $p=0,00625$ (CONOVER, 1971; HOCHBERG & TAMHANE, 1987).

Os resultados obtidos foram analisados, fazendo-se:

verificação da interação entre as variáveis subgrupo (A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, e B4) e os tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15, e R60).

comparações entre os subgrupos isquêmicos do grupo A e os do grupo B, nos períodos de isquemia de 60 minutos (A2 vs B2) e nos períodos de 90 minutos (A4 vs B4), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 minutos de reperusão (R15) e após 60 minutos de reperusão (R60). Testou-se a hipótese da efetividade da ação protetora do *WEB 2086* no aparecimento das lesões celulares ocorridas nos períodos isquêmico e após a reperusão.

comparações entre os tempos de isquemia de 60 e de 90 minutos nos subgrupos isquêmicos do grupo A (A2 vs A4) e nos do grupo B (B2 vs B4), nos tempos C, R0, R15 e R60. Verificou-se a hipótese de influência do tempo de isquemia na efetividade do *WEB 2086* no aparecimento de lesões pós-isquêmicas ou pós-reperfusionais.

comparações entre os subgrupos isquêmicos e os subgrupos controles do grupo A, com 60 minutos de isquemia (A1 vs A2) e com 90 minutos de isquemia (A3 vs A4). A mesma comparação foi realizada no grupo B (B1 vs B2 e B3 vs B4). Foi verificado se a ocorrência ou não de isquemia influenciou no aparecimento de lesões pós-isquêmicas ou pós-reperfusionais e realização de comparações entre os diversos tempos de isquemia e reperusão (C, R0, R15 e R60), em cada subgrupo dos grupos A e B.

RESULTADO

3. RESULTADO

Os resultados obtidos nas avaliações bioquímicas sérica e tecidual, hemodinâmica e na análise histológica dos animais estudados, encontram-se nas tabelas 1 a 9 do apêndice.

3.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE

Nas tabelas 10, 11 e 12 (apêndice) estão representados, respectivamente, os valores das médias e desvio padrão dos níveis séricos das variáveis transformadas das aminotransferases AST, ALT e da fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅), dos animais dos subgrupos A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, e B4, nos diferentes tempos de isquemia e reperfusão C, R0, R15 e R60.

3.1.1 Aspartato Aminotransferase (AST)

Na figura 1 estão representados os valores da variável AST (UI/L), obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico antes do início da isquemia hepática seletiva) e aqueles obtidos nos animais do grupo B (*WEB 2086*, 10 mg/kg de peso corpóreo, cinco minutos antes do início da isquemia hepática seletiva). Estes animais foram distribuídos em subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3), nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

Não se observou diferença estatisticamente significante entre as médias dos subgrupos isquêmicos de 60 minutos (A2 e B2), nem entre as médias dos subgrupos isquêmicos de 90 minutos (A4 e B4) nos tempos C, R0, R15 e R60.

As médias de AST dos subgrupos isquêmicos (A2, A4, B2 e B4) foram maiores, nos tempos de reperfusão R15 e R60, em relação às médias de seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1 e B3) ($p < 0,05$).

As médias dos subgrupos A2 e A4, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60), não apresentaram diferença estatística significativa. O mesmo foi observado para os subgrupos B2 e B4.

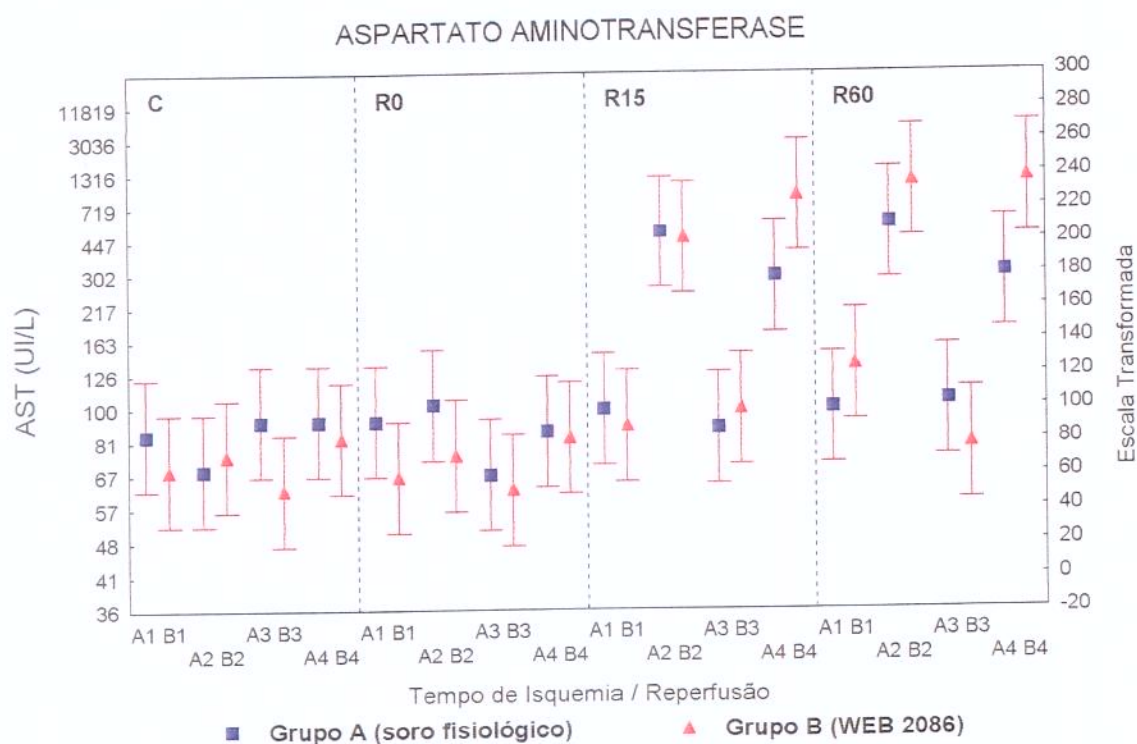


Figura 1 - Gráfico de interferência para AST (UI/L).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores de aspartato aminotransferase dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R15 $\rightarrow$ A2 vs A1; A4 vs A3; B2 vs B1 e B4 vs B3

C $\equiv$ R0 < R15 e R60 (A2, A4, B2 e B4)

As médias dos subgrupos A2, A4, B2 e B4 foram maiores ($p < 0,05$), aos 15 e 60 minutos de reperfusão, em relação aos tempos C e R0.

3.1.2 Alanina Aminotransferase (ALT)

Na figura 2 estão representados os valores da variável ALT (UI/L) obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico) e os obtidos nos animais do grupo B (*WEB 2086*), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3), nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

A média de ALT do subgrupo B4, aos 15 minutos de reperfusão, foi maior que a média do subgrupo A4 ($p < 0,05$). Não se observou diferença estatística significativa entre os subgrupos B2 e A2 em nenhum dos tempos.

A comparação entre os subgrupos A2 e A4, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60), não apresentou diferença estatística significativa. O mesmo foi observado na comparação entre os subgrupos B2 e B4.

Os subgrupos isquêmicos (A2, A4, B2 e B4) mostraram, aos 15 e 60 minutos de reperfusão, médias de ALT maiores que as dos respectivos subgrupos controle ($p < 0,05$). As médias de ALT dos subgrupos isquêmicos A2, A4, B2 e B4 foram maiores ($p < 0,05$), aos 15 e 60 minutos de reperfusão, em relação às médias dos tempos pré-isquêmico (C) e ao final do tempo isquêmico (R0).

3.1.3 Fração 5 da Desidrogenase Láctica (DHL₅)

Na figura 3 encontram-se representados os valores da variável DHL₅ (UI/L).

A média de DHL₅ no subgrupo isquêmico B4, após 60 minutos de reperfusão, foi maior que a observada no subgrupo A4 ($p < 0,05$). Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos A2 e B2, em qualquer um dos tempos de isquemia/reperfusão.

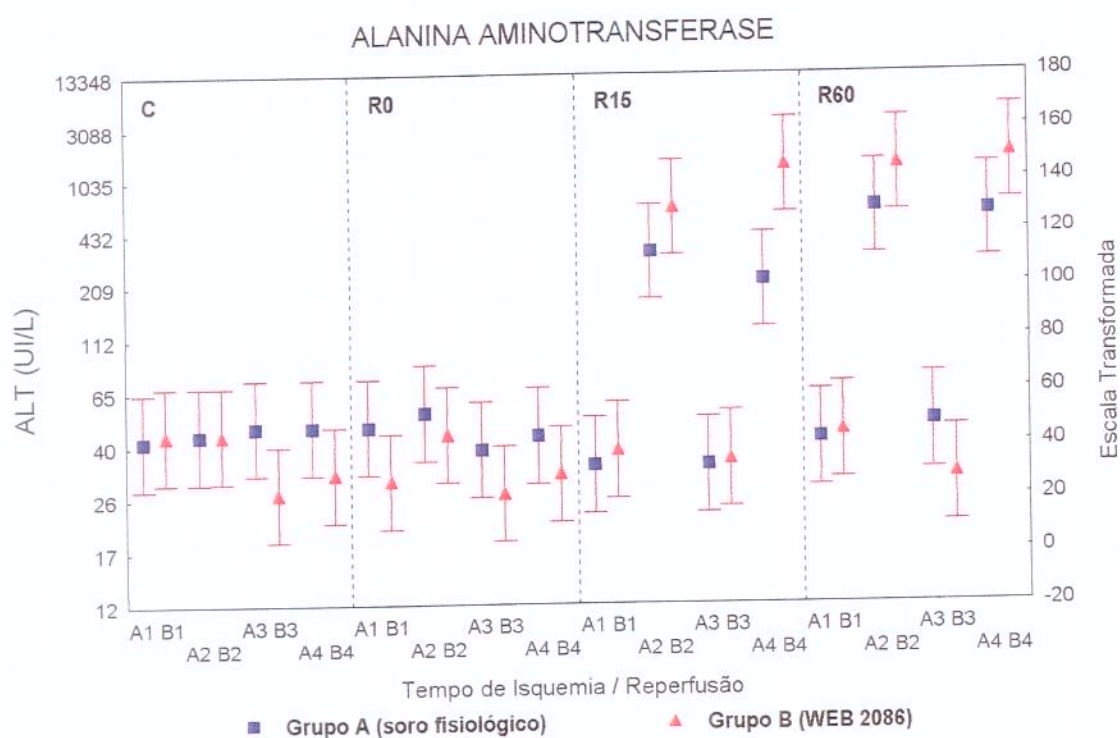


Figura 2 - Gráfico de interferência para ALT (UI/L).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores de alanina aminotransferase dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R15 $\rightarrow$ A4 vs B4; A2 vs A1; A4 vs A3; B2 vs B1 e B4 vs B3

C $\cong$ R0 < R15 e R60 (A2, A4, B2 e B4)

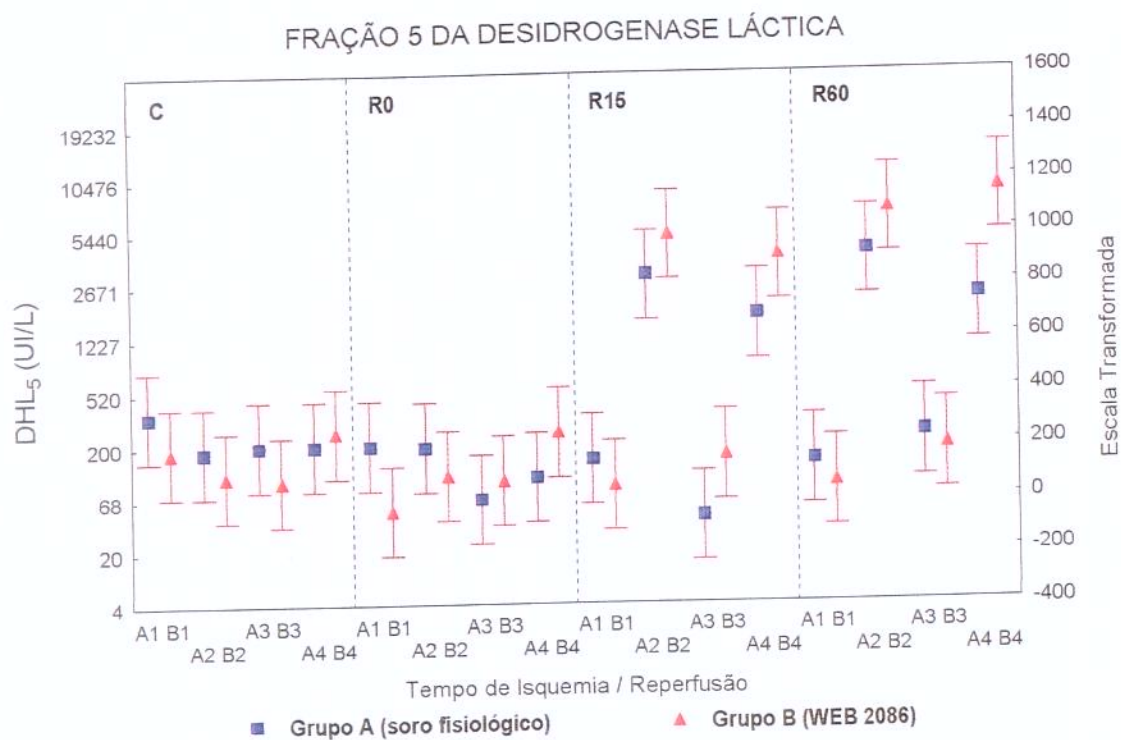


Figura 3 - Gráfico de interferência para DHL₅ (UI/L).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores da fração 5 da desidrogenase láctica dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R15 e R60 $\rightarrow$ A2 vs A1; A4 vs A3; B2 vs B1; B4 vs B3

R60 $\rightarrow$ A4 vs B4

C $\cong$ R0 < R15 e R60 (A2, A4, B2 e B4)

Na comparação entre os subgrupos A2 e A4, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60), não se verificou diferença estatisticamente significante. O mesmo foi observado na comparação entre os subgrupos B2 e B4,

Os subgrupos isquêmicos (A2, A4, B2 e B4) apresentaram médias maiores de DHL_s, comparados aos seus correspondentes subgrupos não isquêmicos (A1, A3, B1 e B3), após 15 e 60 minutos do início da reperfusão ($p < 0,05$).

As médias dos valores da DHL_s, observadas nos subgrupos isquêmicos (A2, B2, A4 e B4), foram maiores e estatisticamente significantes aos 15 e 60 minutos de reperfusão em relação às observadas nos tempos C e R0.

3.2 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA TECIDUAL HEPÁTICA

3.2.1 Avaliação da Função Mitochondrial

Nas tabelas 13, 14 e 15 estão apresentados, respectivamente, os valores das variáveis consumo de oxigênio do estado III, estado IV da respiração mitocondrial e razão de controle respiratório. De acordo com a análise estatística realizada, observou-se interação entre subgrupo e tempo de reperfusão em todas as variáveis acima ($p < 0,01$).

3.2.1.1 Consumo de oxigênio no estado III da respiração mitocondrial (EIII)

Na figura 4 estão representados os valores de consumo de oxigênio do estado III da respiração mitocondrial ($\mu\text{M O}_2/\text{min.mg proteína.}10^{-3}$), obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico) e aqueles obtidos nos animais do grupo B (WEB 2086), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3) nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

O subgrupo isquêmico A2 apresentou média menor que o subgrupo isquêmico B2 ($p < 0,05$), aos 15 minutos de reperfusão. As médias dos subgrupos isquêmicos A4 e B4 não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos tempos C, R0, R15 e R60.

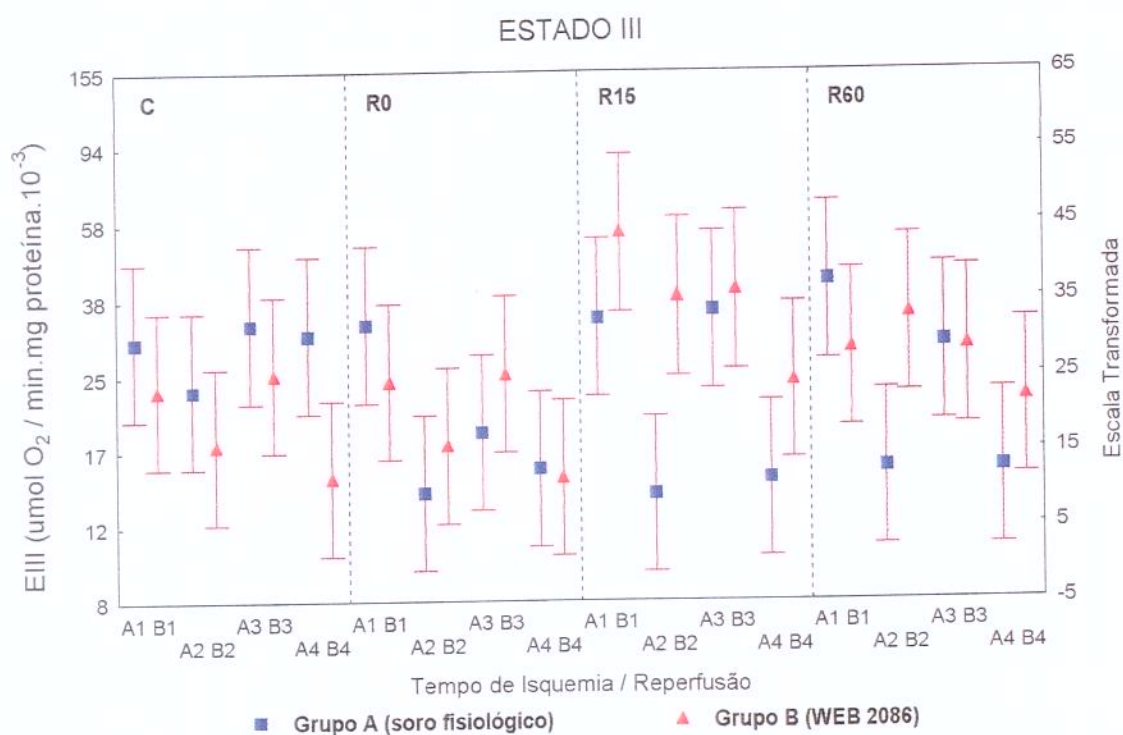


Figura 4 - Gráfico de interferência para E III ($\mu\text{mol de O}_2 / \text{mg proteína} \cdot 10^{-3}$).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores do consumo de oxigênio no estado III da respiração mitocondrial dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (WEB 2086 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R0 $\rightarrow$ A2 vs A1

R15 $\rightarrow$ A2 vs B2; A2 vs A1; A4 vs A3

R60 $\rightarrow$ A2 vs A1

A comparação entre os subgrupos A2 e A4, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60), não apresentou diferença estatística significativa. O mesmo foi observado na comparação entre os subgrupos B2 e B4,

Na comparação entre os subgrupos isquêmicos do grupo B (B2 e B4) e seus respectivos subgrupos controle (B1 e B3), nos diversos tempos de isquemia/reperfusão, observou-se que não houve diferença estatística significativa. Os subgrupos isquêmicos do grupo A (A2 e A4) apresentaram médias de EIII menores que seus subgrupos controle (A1 e A3) após 15 minutos de reperfusão. O subgrupo A2 apresentou também média menor de EIII ($p < 0,05$) que o subgrupo A1, ao final dos 60 minutos de isquemia e após 60 minutos de reperfusão (R60).

A comparação entre os diversos tempos de isquemia/reperfusão no subgrupo isquêmico A2 não revelou diferença estatisticamente significante. O mesmo foi observado para os subgrupos A4, B2 e B4.

3.2.1.2 Consumo de oxigênio no estado IV da respiração mitocondrial (EIV)

Na figura 5 estão representados os níveis do consumo de oxigênio do estado IV da respiração mitocondrial ($\mu\text{M de O}_2/\text{min. mg proteína. } 10^{-3}$), obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico) e os obtidos nos animais do grupo B (WEB 2086), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3) nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

A média do subgrupo isquêmico B2 foi maior que a do subgrupo isquêmico A2 nos tempos R15 e R60 ($p < 0,05$). Esta diferença não foi observada entre os subgrupos isquêmicos A4 e B4.

Na comparação entre os subgrupos A2 e A4, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60), não se verificou diferença estatística significativa. O mesmo foi observado na comparação entre os subgrupos B2 e B4.

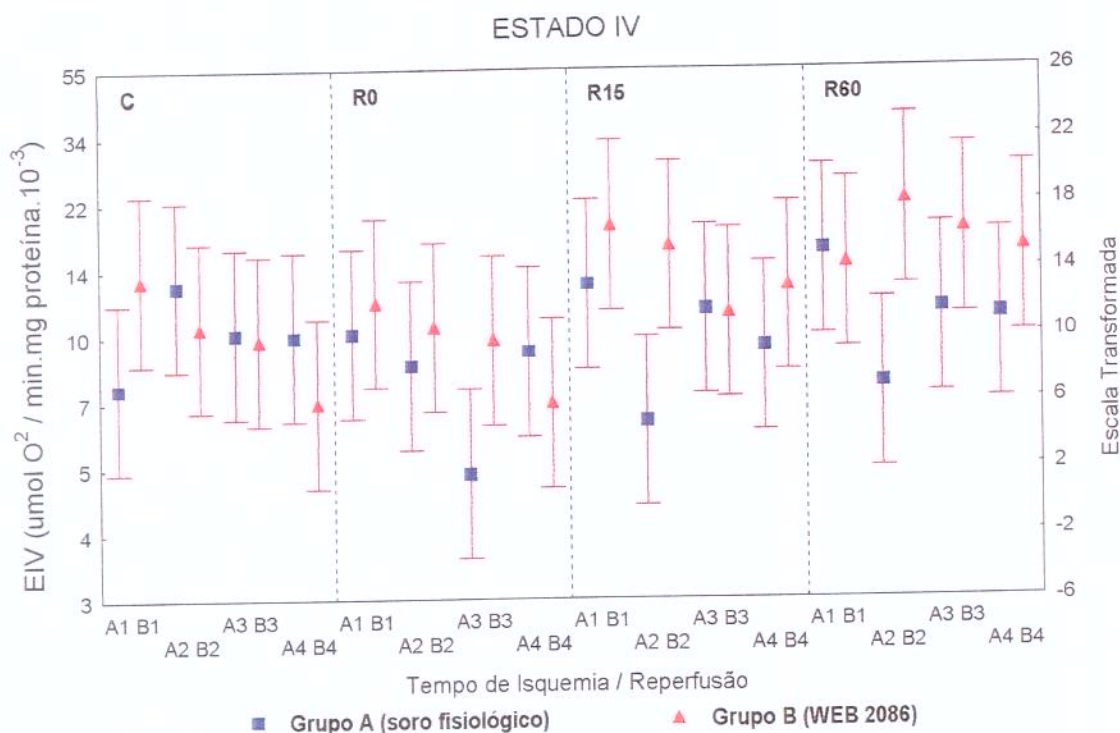


Figura 5 - Gráfico de interferência para E IV ($\mu\text{mol de O}_2 / \text{mg proteína} \cdot 10^{-3}$).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores do consumo de oxigênio no estado IV da respiração mitocondrial dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15 e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R15 e R60 $\rightarrow$ A2 vs B2

Os subgrupos isquêmicos do grupo A (A2 e A4) e os do grupo B (B2 e B4) não diferiram de seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1 e B3), nos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60).

A comparação entre os diversos tempos de isquemia/reperfusão no subgrupo isquêmico A2, não revelou diferença estatisticamente significativa. O mesmo foi observado para os subgrupos A4, B2 e B4.

3.2.1.3 Razão de controle respiratório (RCR)

Na figura 6 estão representados os níveis da razão de controle respiratório, obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico) e aqueles obtidos nos animais do grupo B (*WEB 2086*), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3) nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

Na comparação entre os subgrupos isquêmicos A2 e B2, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão, não se verificou diferença estatisticamente significativa. O mesmo foi constatado entre os subgrupos isquêmicos de 90 minutos (A4 e B4).

Na comparação entre os subgrupos isquêmicos A2 e A4, nos diversos tempos de isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60), não se verificou diferença estatística significativa. O mesmo foi observado na comparação entre os subgrupos B2 e B4.

Quando comparados a seus respectivos subgrupos controle (A3 e A1), os subgrupos isquêmicos A4 e A2 mostraram médias de RCR menores ($p < 0,05$) ao final do tempo de isquemia (R0). O subgrupo A2 apresentou, já no tempo pré-isquêmico, média de RCR menor do que seu subgrupo controle A1 ($p < 0,05$). Esta diferença manteve-se também ao final da isquemia (R0).

O subgrupo controle B1 apresentou média menor ($p < 0,05$) que o subgrupo A1 no tempo pré-isquêmico (C).

A média do subgrupo A4 foi maior, no período pré-isquêmico (C), em relação às obtidas após 15 e 60 minutos de reperfusão ($p < 0,05$). Os outros subgrupos isquêmicos não

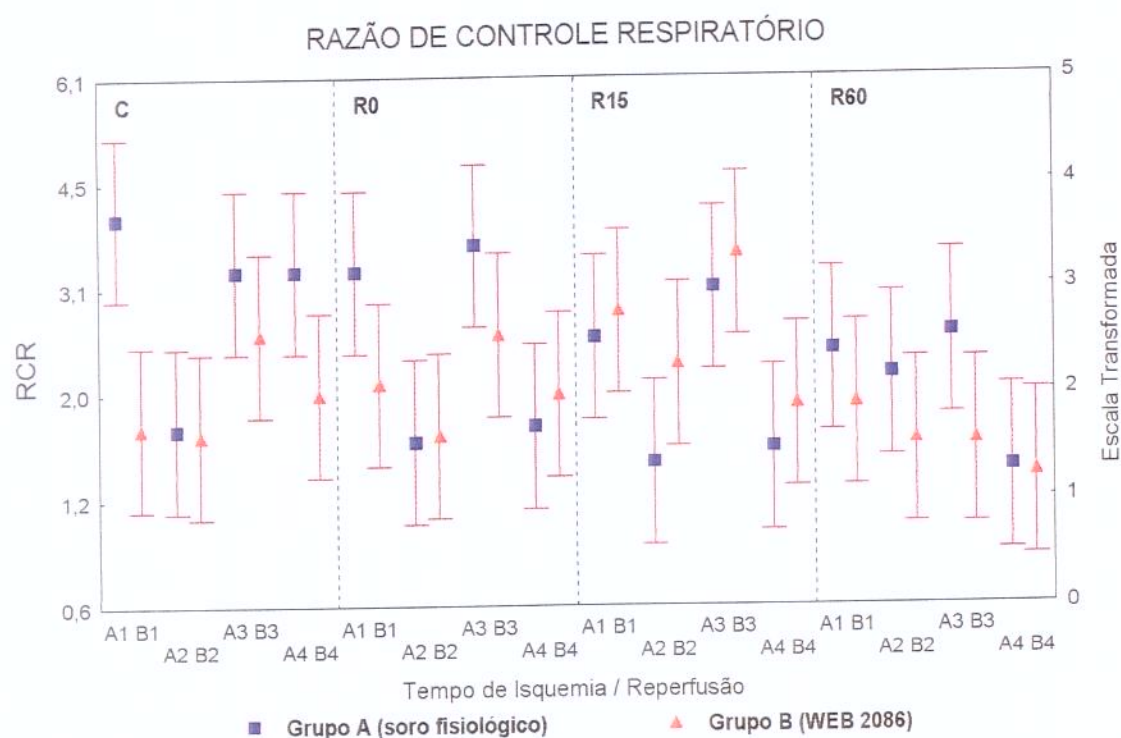


Figura 6 - Gráfico de interferência para RCR.

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores da razão de controle respiratório dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperusão R15, e após 60 minutos de reperusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

C $\rightarrow$ A2 vs A1 e A1 vs B1

R0 $\rightarrow$ A2 vs A1 e A4 vs A3

C > R60 (A4)

mostraram diferença estatística significativa entre os diversos tempos de isquemia/reperfusão.

3.2.2 Avaliação da Lipoperoxidação Mitocondrial

Nas tabelas 16 e 17 (apêndice) estão apresentados, respectivamente, os valores das médias e desvio padrão das variáveis malondialdeído e glutathiona hepática. Observou-se a presença de interação entre subgrupo e tempo de isquemia/reperfusão ($p < 0,01$).

3.2.2.1 Conteúdo hepático de malondialdeído (MDA)

Na figura 7 estão representados os valores do conteúdo hepático de MDA (nmol/mg proteína), obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico) e aqueles obtidos nos animais do grupo B (WEB 2086), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3) nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

Não foi observada diferença estatisticamente significante entre os subgrupos isquêmicos do grupo A e os do grupo B, aos 60 ou 90 minutos de isquemia, em relação aos diversos tempos da isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60).

Os subgrupos isquêmicos do grupo A (A2 e A4) não apresentaram diferença estatística significante entre suas médias nos diversos tempos da isquemia/reperfusão. O mesmo resultado foi encontrado nos subgrupos isquêmicos do grupo B (B2 e B4).

Os subgrupos isquêmicos do grupo A (A2 e A4) e os subgrupos isquêmicos do grupo B (B2 e B4) não mostraram diferença estatisticamente significante em relação às médias de seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1 e B3), nos diversos momentos da isquemia/reperfusão (C, R0, R15 e R60).

A comparação entre os diversos tempos de isquemia/reperfusão no subgrupo isquêmico A2 não revelou diferença estatisticamente significante. O mesmo foi observado para os subgrupos B2 e B4. Os subgrupos controle A1 e A3 mostraram médias menores no período pré-isquêmico e ao final do tempo de isquemia do que as dos tempos R15 e R60

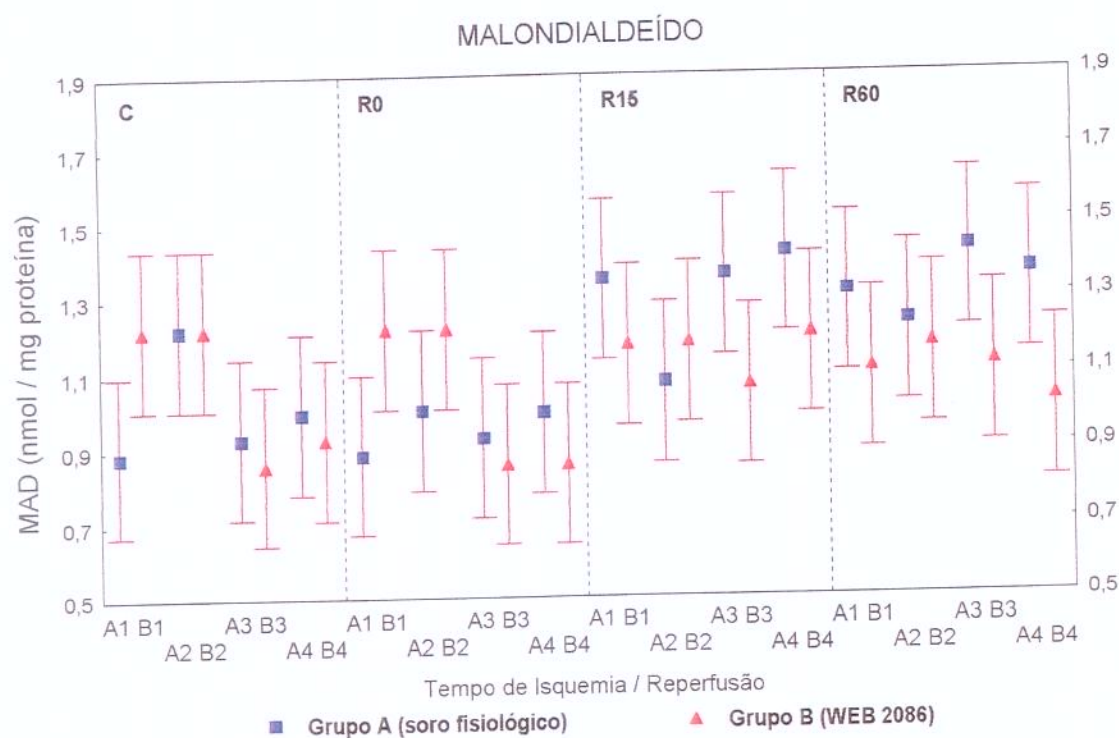


Figura 7 - Gráfico de interferência para MDA (nmol / mg proteína).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores do conteúdo hepático de malondialdeído dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

$C \cong R0 < R15$ e $R60$ (A1 e A3)

$C \cong R0 < R15$ (A4)

($p < 0,05$). Aos 15 minutos de reperfusão, observou-se que a média de A4 foi maior em relação aos tempos C e R0 ($p < 0,05$).

3.2.2.2 Conteúdo hepático de glutathiona (GSH)

Na figura 8 estão representados os valores do conteúdo hepático de GSH (nmol/mg proteína), obtidos nos animais do grupo A (soro fisiológico) e os obtidos nos animais do grupo B (*WEB 2086*), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3), nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

O subgrupo isquêmico B4 apresentou média maior de GSH do que o subgrupo A4 aos 15 minutos de reperfusão ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa entre os subgrupos A2 e B2 em nenhum dos tempos de isquemia/reperfusão.

O subgrupo isquêmico de 90 minutos (B4) apresentou média de GSH menor ($p < 0,05$) que o subgrupo isquêmico de 60 minutos (B2), após 60 minutos de reperfusão (R60). Não houve diferença estatística significativa entre os subgrupos A2 e A4 nos diversos tempos de isquemia/reperfusão.

Quando os subgrupos isquêmicos (A2, A4, B2 e B4) foram comparados a seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, A4 e B3), nos diversos tempos da isquemia/reperfusão, observou-se que o subgrupo B4 apresentou média de GSH menor que seu subgrupo controle B3 ($p < 0,05$) aos 60 minutos de reperfusão (R60).

O subgrupo isquêmico A2 apresentou média de GSH menor aos 15 minutos de reperfusão, em relação ao período pré-isquêmico (C) e ao término do período isquêmico ($p < 0,05$). O subgrupo A4 apresentou médias maiores nos períodos pré-isquêmico e ao término da isquemia, em relação ao período de 15 e 60 minutos após a reperfusão ($p < 0,05$). O subgrupo B4 apresentou média menor após 60 minutos de reperfusão, em relação aos tempos C, R0 e R15 ($p < 0,05$).

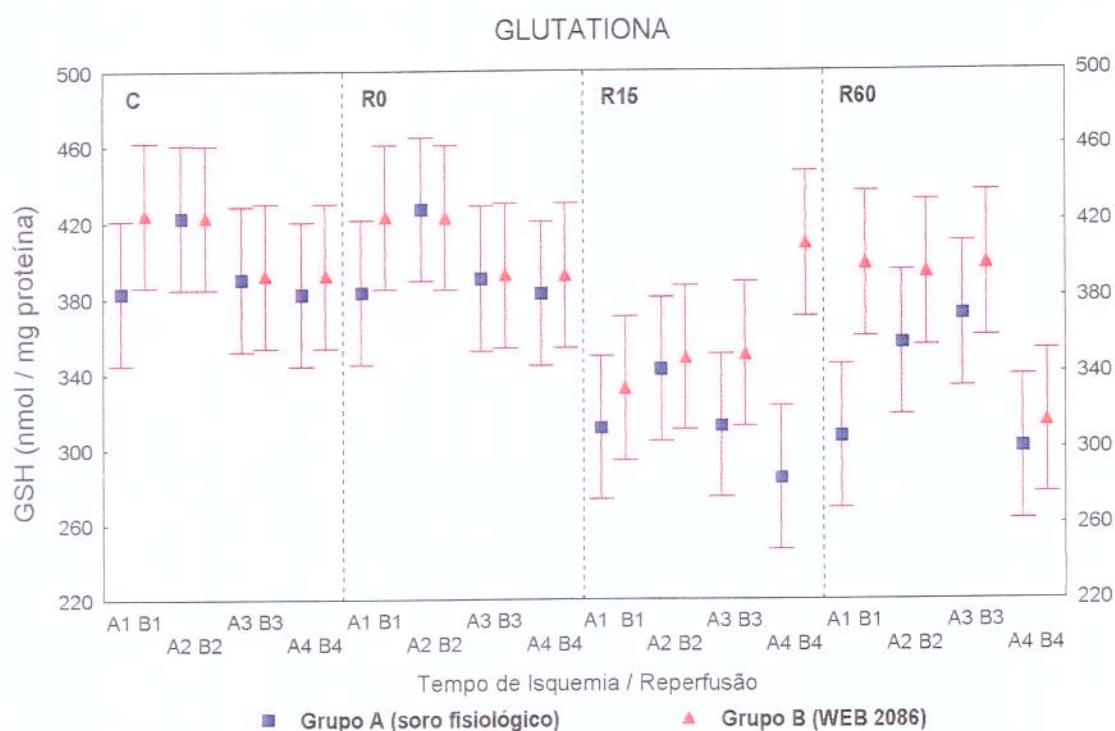


Figura 8 - Gráfico de interferência para GSH (nmol / mg proteína)

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores do conteúdo hepático de glutatona dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (WEB 2086 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R15 $\rightarrow$ A4 vs B4

R60 $\rightarrow$ A1 vs B1; B2 vs B4 e B3 vs B4

C $\cong$ R0 > R15 (A2 e B1)

C $\cong$ R0 $\cong$ R15 > R60 (B4)

C $\cong$ R0 > R15 e R60 (A4)

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nas figuras 9, 10, 11, 12 e nas tabelas 18, 19, 20 e 21 (apêndice) estão representadas as frequências (%) do grau de acometimento hepático, observadas nas variáveis congestão, vacuolização citoplasmática, presença de polimorfonucleares neutrófilos nos espaços porta e necrose.

Estas observações foram obtidas nas biópsias hepáticas dos animais do grupo A (soro fisiológico) e aquelas obtidas dos animais do grupo B (*WEB 2086*), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3) nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60).

As variáveis que apresentaram diferença estatística foram congestão e vacuolização citoplasmática. Observou-se necrose nos graus leve e moderado, após o início da reperfusão, porém sem significância estatística entre os diversos subgrupos estudados. Observou-se o mesmo em relação a presença de polimorfonucleares neutrófilos nos espaços porta (figuras 13 e 14).

O grau de acometimento da congestão foi maior após 15 e 60 minutos de reperfusão, em relação ao período isquêmico ($p < 0,05$). Os subgrupos isquêmicos apresentaram maior frequência de congestão de graus moderado e severo em relação aos subgrupos controle, em todos os períodos de isquemia/reperfusão, sendo mais acentuado após o início da reperfusão ($p < 0,001$).

A vacuolização citoplasmática apresentou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos, ao final do tempo de isquemia (R0) e após 15 minutos do início da reperfusão ($p < 0,005$). Das comparações múltiplas programadas houve apenas diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos A4 e B4 no tempo R0 (grau de acometimento em B4 > A4) e entre os subgrupos B2 e B1 aos 15 minutos de reperfusão (grau de acometimento em B2 > B1).

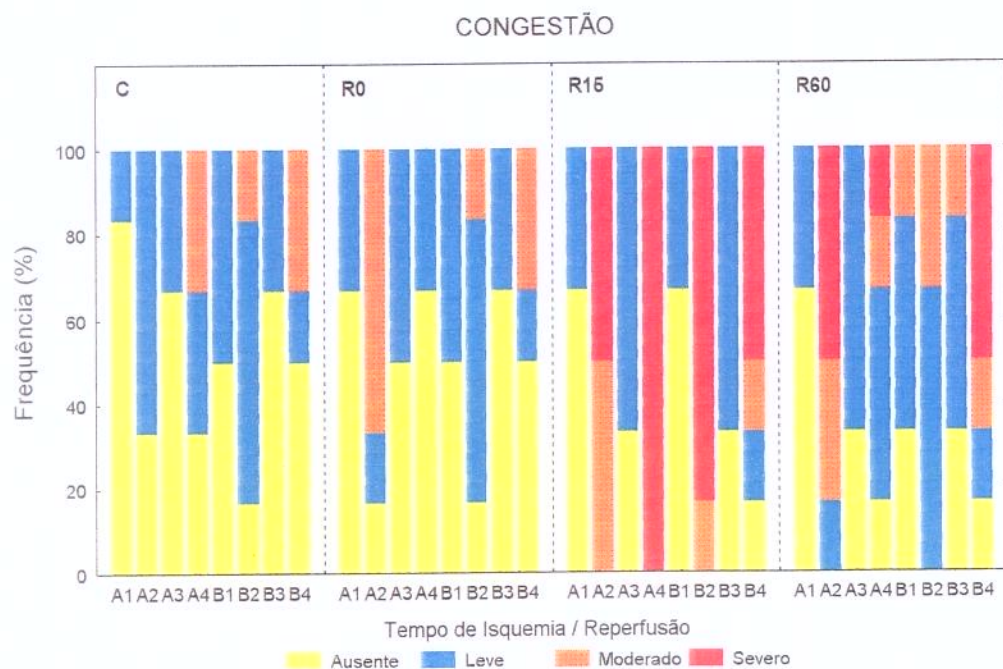


Figura 9 - Gráfico de frequência do grau de congestão

Frequência do grau de congestão nas biópsias hepáticas dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperusão R15, e após 60 minutos de reperusão R60. Houve diferença estatística entre os grupos isquêmicos e os subgrupos controle mais acentuado nos tempos R15 e R60 ($p < 0,05$).

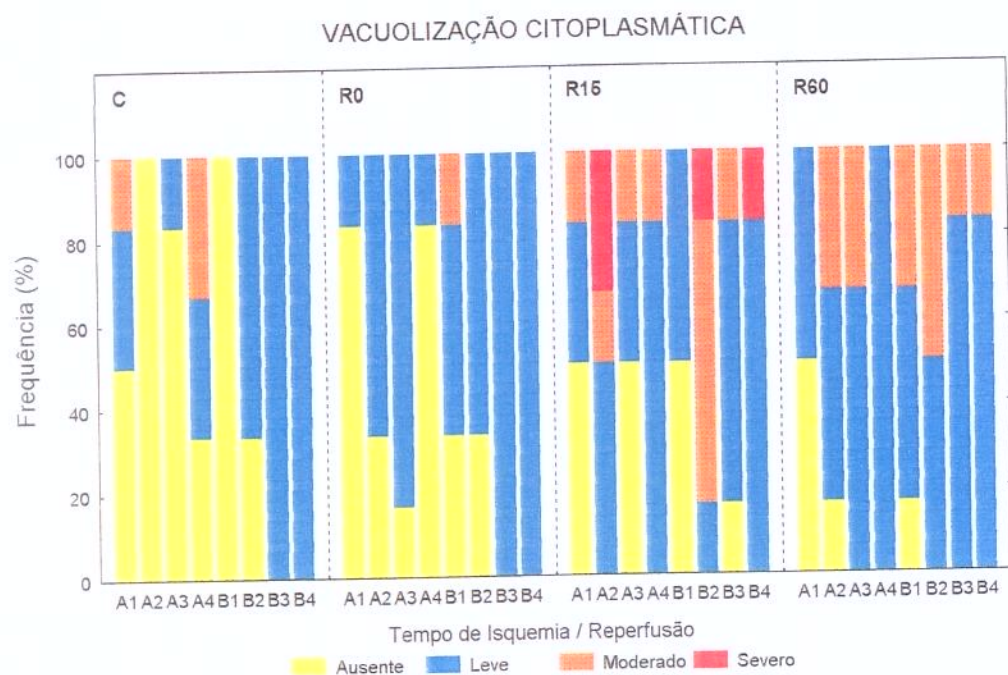


Figura 10 - Gráfico de frequência do grau de vacuolização citoplasmática

Frequência do grau de vacuolização nas biópsias hepáticas dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperusão R15, e após 60 minutos de reperusão R60. Houve diferença estatística entre os tempos de isquemia/reperusão R0 e R15 ($p < 0,05$)

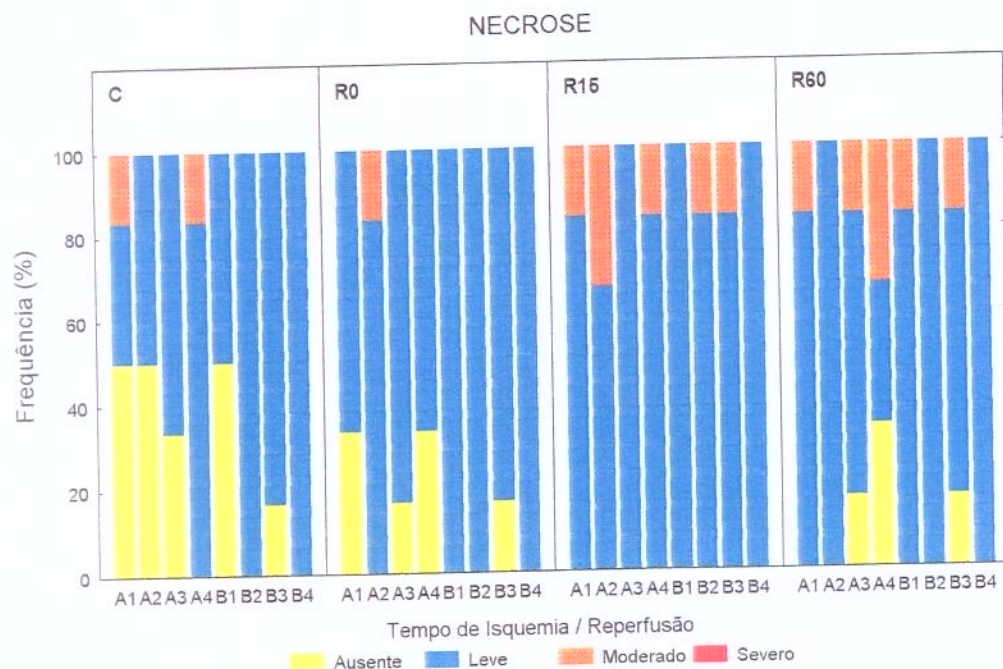


Figura 11 - Gráfico de frequência do grau de necrose

Frequência do grau de necrose nas biópsias hepáticas dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15, e após 60 minutos de reperfusão R60. Não houve diferença estatística entre os grupos A e B e subgrupos nos diversos tempos de isquemia e reperfusão.

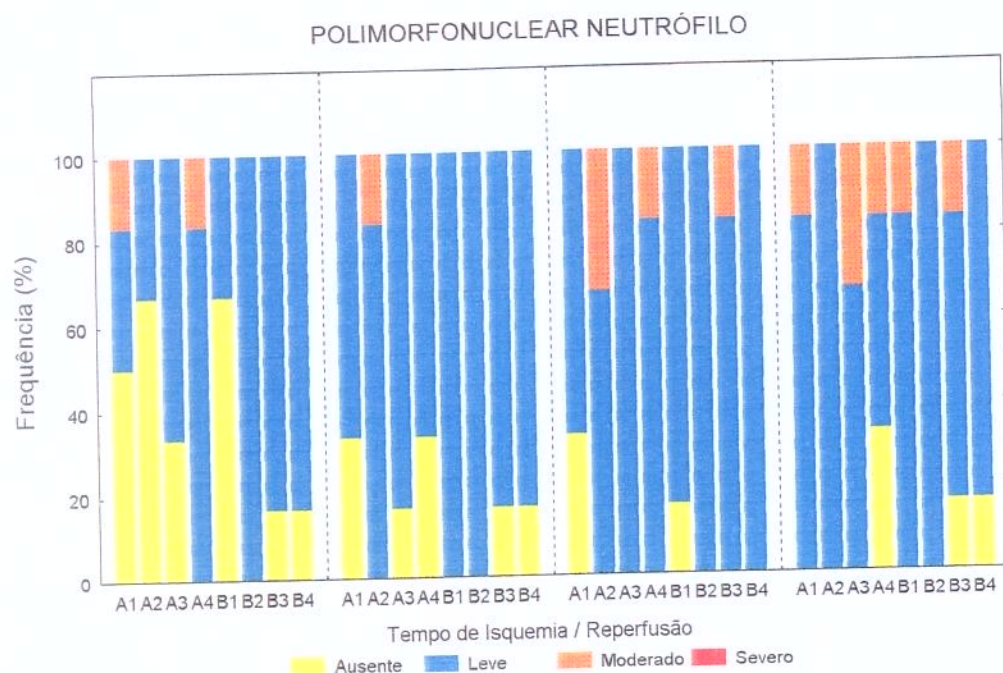


Figura 12 - Gráfico de frequência da presença de polimorfonucleares neutrófilos

Frequência dos polimorfonucleares neutrófilos nas biópsias hepáticas dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15 e após 60 minutos de reperfusão R60. Não houve diferença estatística entre os grupos A e B e subgrupos nos diversos tempos de isquemia e reperfusão.

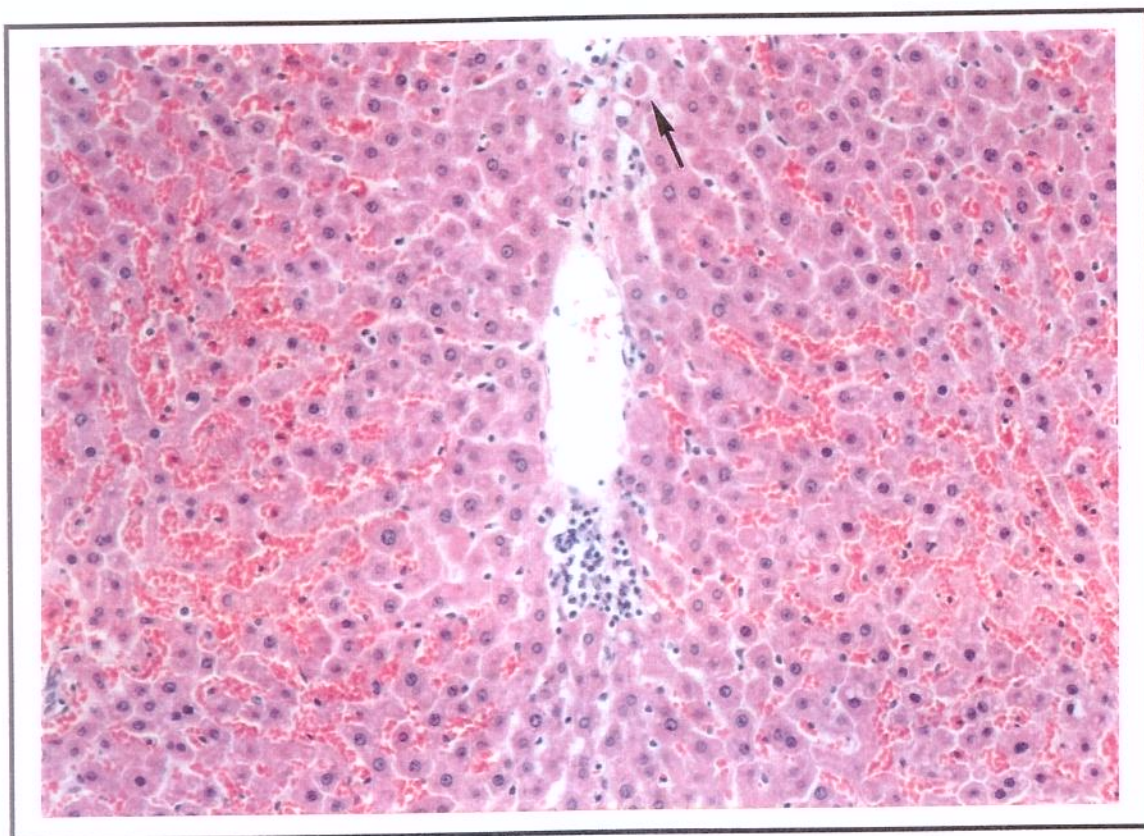


Figura 13 - Aspectos microscópicos (subgrupo A4/R15)

Microscopia óptica de animal (nº 6) do grupo A (soro fisiológico) submetido a 90 minutos de isquemia hepática seletiva normotérmica e 15 minutos de reperfusão. Notar presença de focos de necrose hepatocelular em zona 3 acinar, com infiltrado inflamatório linfomononuclear, congestão sinusoidal moderada e corpúsculo de Councilman-Rocha Lima na ponta da seta. (H&E x 264).

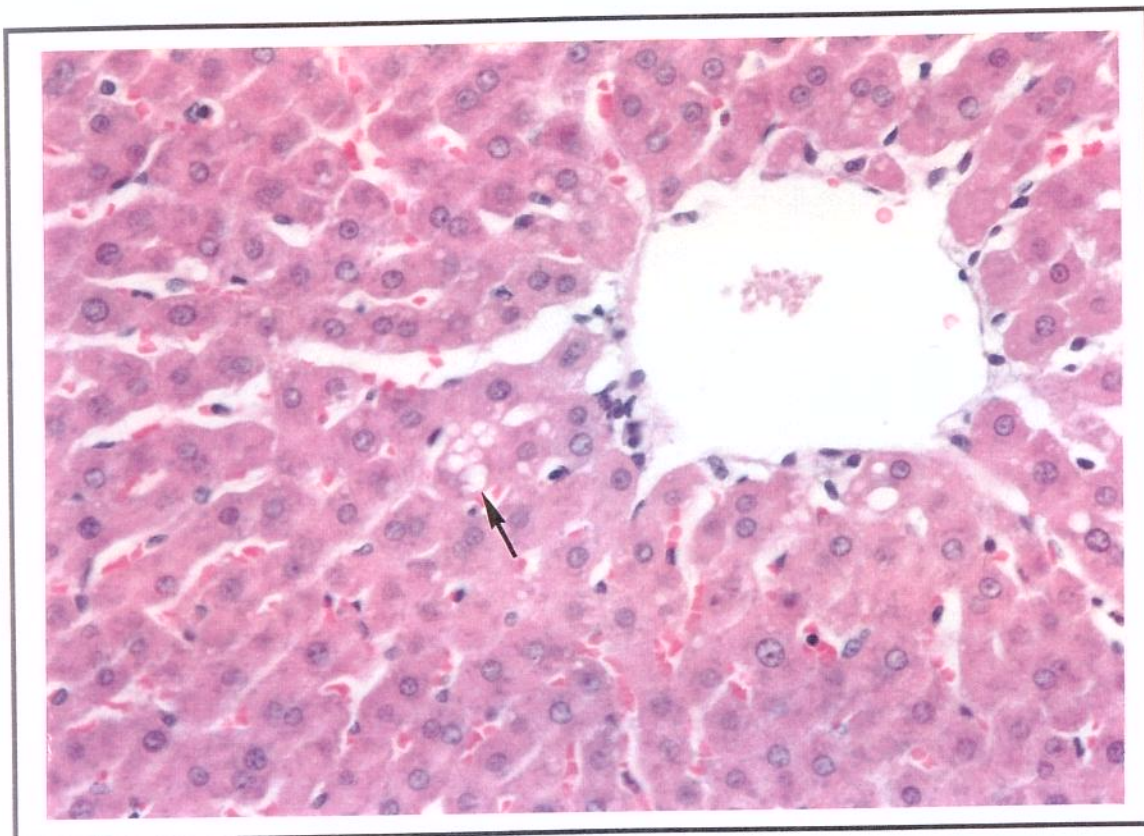


Figura 14 - Aspectos microscópicos (subgrupo B4/R15)

Microscopia óptica de animal (nº 6) do grupo B (*WEB 2086* 10 mg/kg peso corpóreo) submetido a 90 minutos de isquemia hepática seletiva normotérmica e 15 minutos de reperfusão. Notar hepatócitos em zona 3 acinar com intensa vacuolização citoplasmática (H&E x 528).

3.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Nas tabelas 22 e 23 (apêndice) estão apresentados os valores das médias e desvio padrão da pressão arterial média e da pressão venosa central dos 48 animais distribuídos no grupo A (soro fisiológico) e no grupo B (*WEB 2086*), submetidos à isquemia hepática seletiva de 60 minutos (subgrupos A2 e B2) e a 90 minutos de isquemia (subgrupos A4 e B4), assim como seus respectivos subgrupos controle (A1, B1, A3 e B3). Os animais foram estudados nos períodos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos de reperfusão (R15) e após 60 minutos de reperfusão (R60).

3.4.1 Pressão Arterial Média (PAM)

As médias da PAM (mmHg) dos animais estão representados na figura 15.

Aos 15 minutos de reperfusão, a pressão arterial média do subgrupo B4 apresentou média maior do que no subgrupo A4 ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os subgrupos A2 e B2, para todos os diferentes tempos de isquemia/reperfusão.

Os subgrupos isquêmicos de 60 minutos (A2 e B2) comparados aos subgrupos isquêmicos de 90 minutos (A4 e B4), não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos (C, R0, R15 e R60).

A média de níveis pressóricos do subgrupo isquêmico A4 foi menor do que a de seu subgrupo controle A3 aos 15 minutos de reperfusão ($p < 0,05$). Os outros subgrupos isquêmicos (A2, B2 e B4), quando comparados a seus subgrupos controle (A1, B1 e B3), não apresentaram diferença estatisticamente significativa, em nenhum dos tempos de isquemia/reperfusão.

3.4.2 Pressão Venosa Central (PVC)

As médias da pressão venosa central (cmH₂O) estão apresentadas na figura 16.

Apenas o fator subgrupo apresentou significância estatística ($p < 0,05$), observada entre os subgrupos isquêmicos A4 e B4.

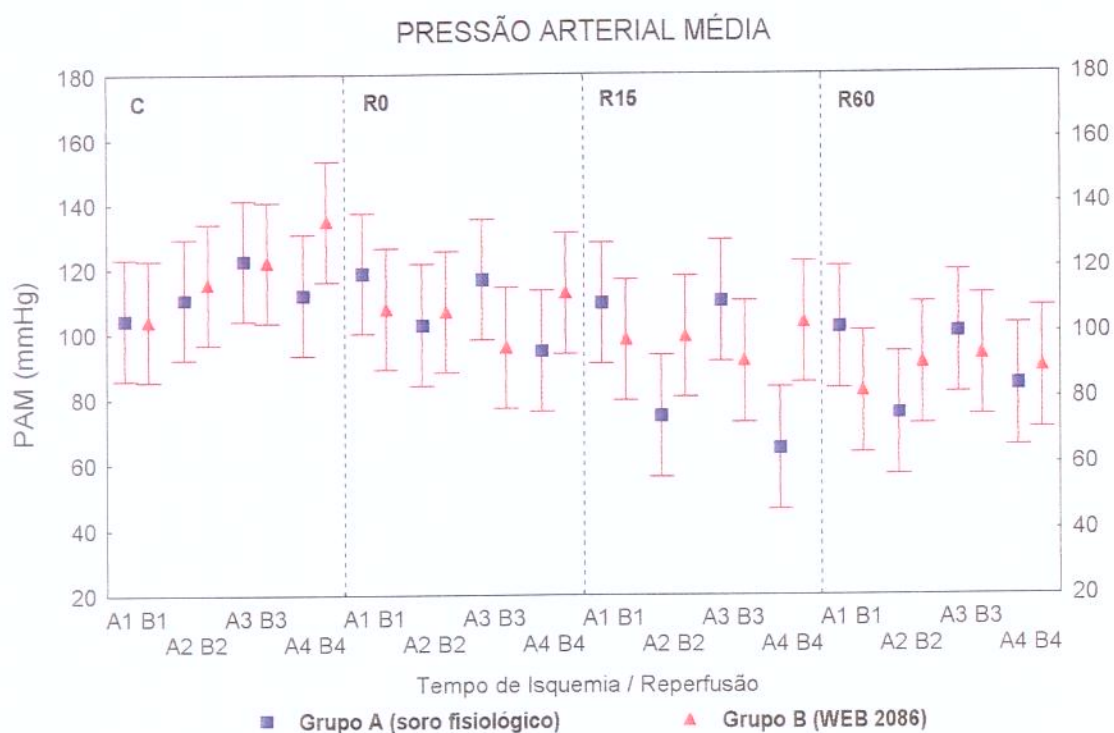


Figura 15 - Gráfico de interferência para PAM (mmHg).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores da pressão arterial média dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15 e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

R15 $\rightarrow$ A4 vs B4 e A4 vs A3

C < R60 (B4)

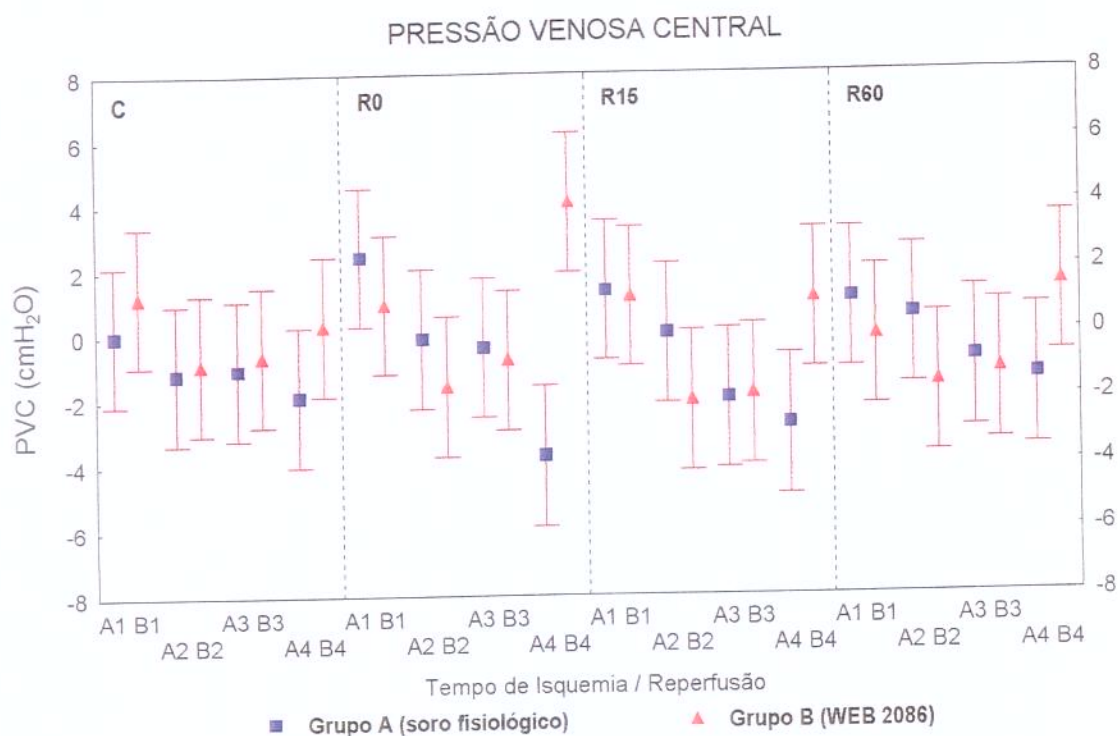


Figura 16 - Gráfico de interferência para PVC (cmH₂O).

Representação das médias $\pm$ HSD/2. Valores da pressão venosa central dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086* 10 mg/kg de peso corpóreo), submetidos a 60 (A2 e B2) minutos de isquemia e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle de 60 (A1 e B1) e de 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico C, ao final da isquemia R0, após 15 minutos de reperfusão R15 e após 60 minutos de reperfusão R60.

Ausência de sobreposição indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$):

A4 vs B4

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Desde o século XVII há relatos na literatura sobre as alterações hepáticas ocorridas após a indução da isquemia do fígado (* MALPIGHI, 1699). Com o aparecimento de extensas áreas de necrose e morte dos animais submetidos aos experimentos, procurou-se o melhor local para a realização da ligadura dos vasos da tríade portal, que permitisse menor necrose e maior sobrevivência (HABERER, 1906). Em 1908, PRINGLE descreveu o pinçamento da tríade portal que desde então tem sido muito utilizado nas cirurgias de trauma hepático, ressecções hepáticas cirúrgicas segmentares ou amplas e, mais modernamente, nos transplantes hepáticos.

Em cirurgia experimental esta técnica vem sendo utilizada para elucidar as consequências da isquemia hepática e, mais recentemente, as lesões secundárias à reperfusão do órgão. Com a utilização da exclusão vascular total durante longos períodos, observou-se necrose hepática e morte dos animais de experimentação (MARKOWITZ *et al.*, 1949; CHAU *et al.*, 1951; MARKOWITZ, 1952). Concomitantemente, novos trabalhos surgiram mostrando a tolerância dos animais submetidos à isquemia hepática temporária, com tempo menor que 60 minutos e com reperfusão intermitente evitando, assim, anaerobiose, proliferação bacteriana e sequestração no leito vascular esplâncnico (RAFFUCCI & WAGENSTEEN, 1950; RAFFUCCI, 1953; STEINER & MARTINEZ, 1961; BACKLUND *et al.*, 1964; NORDLINGER *et al.*, 1980)

Vários trabalhos têm sido realizados com tempos de isquemia hepática que variam de 1 a 4 horas e com tempos e modos de reperfusão variáveis. O que procuram explicar são os tipos de lesões que podem ocorrer ou, ainda mais adiante, o que poderá ser realizado para coibir os fenômenos inflamatórios que são modulados durante a isquemia e após a reperfusão (NAKATA, *et al.*, 1971; MARUBAYASHI, *et al.*, 1986; ONTELL *et al.*, 1989; LITTAUER & DE GROOT, 1992; KAWAMURA, *et al.*, 1995; BOIN *et al.*, 1996).

* MALPIGHI, M. *apud* RAFFUCI, F.L. & WAGENSTEEN - The tolerance of dogs to occlusion to entire afferent vascular inflow to the liver. *Surg. Forum* 1: 191-195, 1950

O que ocorre nos organismos submetidos à isquemia hepática seguida de reperfusão é uma interação complexa entre alterações microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, liberação de radicais livres de oxigênio, ativação de neutrófilos, plaquetas, células de Kupffer e das células sinusoidais endoteliais. A ativação destas células podem levar à liberação de fator de necrose tumoral (TNF), leucotrienos, tromboxanas, prostaglandinas, endotelinas (HYSLOP & DE NUCCI, 1991,1992; ESTEBAN *et al.*, 1995; FARO *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1995), fator de ativação plaquetária (KUBES *et al.*, 1990b; FUKUOKA *et al.*, 1993a, 1993b; NISHIYAMA *et al.*, 1993), radicais livres de oxigênio (RLO), tais como ânion superóxido, radicais oxidrila, que sendo instáveis reagem rapidamente e seu efeito citotóxico (JAESCHKE & FARHOOD, 1991) causa danos à membrana celular, membrana mitocondrial e superfície endotelial, levando a distúrbios na microcirculação e consequente hipotensão (AGGARWAL *et al.*, 1989; CALDWELL-KENKEL, *et al.*, 1991; RAUEN *et al.*, 1993; SHIRATORI *et al.*, 1994). Estas alterações, dependendo do tempo da isquemia e do momento da reperfusão estudados, podem mostrar desde simples alterações bioquímicas até necrose e morte celular (McKEOWN *et al.*, 1988; ONTELL *et al.*, 1989; SHIRATORI, *et al.*, 1994; KU *et al.*, 1995).

Buscando reduzir estas alterações inflamatórias que ocorrem durante o binômio isquemia/reperfusão, vários agentes farmacológicos têm sido utilizados, com o objetivo de diminuir as lesões de reperfusão que se instalam durante as cirurgias hepáticas eletivas, de urgência, ou mesmo nos transplantes hepáticos. A prostaciclina tem sido relacionada com a melhora das lesões ocorridas no tempo de isquemia quente (MONDEN & FORTNER, 1982; TOLEDO-PEREYRA, 1984,1991; CRAFA *et al.*, 1991). A clorpromazina tem sido relatada como prevenindo o influxo de cálcio que ocorre durante a reperfusão, inclusive mantendo a função mitocondrial (CHIEN *et al.*, 1977; FARBER *et al.*, 1981).

Os bloqueadores de canais de cálcio, como verapamil e diltiazem, têm sido utilizados contra as lesões ocorridas na isquemia e reperfusão (HUGHES *et al.*, 1986; KURITA *et al.*, 1994). A proteção contra as lesões de reperfusão, mediadas pelos radicais livres de oxigênio e evitando a lipoperoxidação, tem sido atribuída à superóxido dismutase, catalase, alopurinol e prostaglandinas (ATALLA *et al.*, 1985; BAKER *et al.*, 1985; KOYAMA *et al.*, 1985; HANAZAKI *et al.*, 1994). O uso de outro tipos de agentes

antioxidantes ou que agem como tal, por inibir algumas enzimas que agem na cadeia respiratória mitocondrial, também tem sido relatado, tais como alfa-tocoferol, coenzima Q10 (ubiquinona); inibidores da metilglutaril coenzima A (SATO *et al.*, 1994), glutatona, ATP-MgCl₂ e ciclosporina A. Outras substâncias foram utilizadas, atuando como supressores da atividade das células de Kupffer e da produção de TNF (SHIRATORI *et al.*, 1994 e KAWANO *et al.*, 1994), bem como ácidos biliares atuando como hepatocitoprotetores (CHAZOUILLÈRES *et al.*, 1991).

Dos mediadores inflamatórios que interagem na síndrome de isquemia/reperfusão, como relatados por AGGARWAL *et al.* em 1989, o fator ativador de plaquetas (*PAF*) foi relacionado, entre outras substâncias (tromboxana, prostaciclina, prostaglandinas, precalicreína, e leucotrienos), como uma substância vasoativa que causa vasodilatação e exerce efeitos significativos sobre o tônus vascular e pressão sanguínea (FUKUOKA, *et al.*, 1993a). Funcionaria, então, como uma chave na cascata dos mediadores inflamatórios liberados na isquemia/reperfusão, pois pode ser liberado por plaquetas, neutrófilos, células sinusoidais endoteliais, e células de Kupffer. Induz agregação plaquetária, leucocitária, liberação de ânion superóxido e age diretamente sobre o endotélio vascular, aumentando sua permeabilidade (BENVENISTE *et al.*, 1972; CAMUSSI *et al.*, 1981; BRAQUET *et al.*, 1987; WALLACE & MACNAUGHTON, 1988; ONTELL *et al.*, 1989; HENSON, 1990; STAFFORINI *et al.*, 1990; ZIMMERMAN *et al.*, 1990).

Algumas drogas têm sido estudadas como sendo antagonistas do *PAF*, bloqueadores de canais de Na⁺ e de Ca⁺⁺ (KORNECKI *et al.*, 1984; ; TUFFIN & WADE, 1985; HWANG, 1989), apresentando, assim, possível interação com grupos sulfidrilas (HOURANI & CUSAKI, 1991). Outros tipos de antagonistas *PAF*-específicos também já foram relatados como funcionantes na proteção das alterações da isquemia/reperfusão (SRI 63-441, CV 6209, E5880, TCV 309, BN 52021, BN 52022, e WEB 2170 e WEB 2086). São substâncias utilizadas momentos antes do início da isquemia ou adicionadas antes do início da reperfusão, por via venosa, intraperitoneal ou oral, com relatos de efeitos protetores em relação à função mitocondrial, hipotensão, indução de menor adesividade leucocitária, lipoperoxidação, diminuição de liberação de RLO, manutenção da morfologia celular à microscopia óptica ou eletrônica, porém, com controvérsias quanto ao seu efeito como protetor celular hepático, já que dependendo da dose de antagonista utilizado, mantém níveis elevados de enzimas hepáticas após a reperfusão do

órgão (ONTELL *et al.* 1989; FUKUOKA *et al.*, 1992; CHAVEZ-CARTAYA *et al.*, 1994; BOIN *et al.*, 1996).

No presente trabalho procurou-se estudar a efetividade do *WEB 2086*, um antagonista específico do *PAF*, avaliando as alterações enzimáticas séricas das aminotransferases (AST e ALT), da fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅), da função mitocondrial hepática, da lipoperoxidação lipídica e da histopatologia hepática, assim como a avaliação hemodinâmica (pressão arterial média e pressão venosa central) de ratos Wistar submetidos à isquemia hepática seletiva normotérmica.

Foram usados ratos Wistar como animal de experimentação por ser de fácil manuseio, pequeno porte, isogenicidade, e com efeitos farmacodinâmicos do *WEB 2086* já conhecidos (HWANG *et al.*, 1986). Apesar das plaquetas dos ratos, dependendo da dose empregada, serem insensíveis ao *PAF*, estes animais são utilizados principalmente quando se quer estudar o efeito hipotensor do *PAF*, sem os agravantes do efeito broncoconstrictor (CASALS-STENZEL & HEUER, 1990). A escolha do antagonista *WEB 2086* (10 mg/kg de peso corpóreo, antes do início da isquemia) foi feita pela sua disponibilidade em nosso serviço, por ser de fácil manuseio, e ser indicado por alguns autores como sendo mais efetivo na inibição da aderência leucocitária às células sinusoidais endoteliais hepáticas, que ocorre associada a isquemia/reperfusão (KUBES *et al.*, 1990a).

As células hepáticas submetidas à isquemia normotérmica são mais suscetíveis e este fato pode ser explicado pela diferente atividade metabólica e variedade de proteases intracelulares (MCKEOWN *et al.*, 1988; NOACK *et al.*, 1993). Optou-se, portanto, pela isquemia normotérmica, dado o caráter acima mencionado e a possibilidade de melhor análise das alterações encontradas após a isquemia e reperfusão. Embora os fenômenos que ocorrem na isquemia/reperfusão sejam os mesmos descritos em experimentos com animais ou em humanos, CARACENI *et al.* (1994) relataram que os hepatócitos isolados de ratos foram mais suscetíveis à anóxia e à reoxigenação do que os humanos.

Neste trabalho, a seletividade da isquemia hepática (HIGGINS & ANDERSON, 1931; ASAKAWA *et al.*, 1989) foi empregada para evitar a congestão esplâncnica, resultante da exclusão total do suprimento sanguíneo quando se utiliza o pinçamento da tríade portal junto ao duodeno. Estas considerações já foram utilizadas em alguns trabalhos,

como SHIRATORI *et al.* (1994), que demonstraram aumento do fluxo para os lobos não isquemiados, sem a ocorrência de congestão intestinal. Mesmo assim, KAWAMURA *et al.* (1995) induziram isquemia seletiva pelo pinçamento dos vasos portais dos lobos esquerdo lateral e mediano, e detectaram a presença de endotelina dosada no leito portal dos lobos isquemiados, e daqueles não isquemiados (congestão portal parcial). Alguns trabalhos na literatura têm apresentado a liberação de endotelina associada a mudanças hemodinâmicas hepáticas e sistêmicas nos animais submetidos à isquemia e reperfusão (STANSBY *et al.*, 1993; FARO *et al.*, 1995; MEHRABI *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1995).

Como já descrito anteriormente, durante o período da isquemia e reperfusão, ocorre a liberação de substâncias vasoativas, radicais livres de oxigênio (RLO), de interleucinas, fibronectina, do fator de necrose tumoral, de endotelinas, de óxido nítrico, das prostaglandinas, das tromboxanas e do fator de ativação plaquetária (PAF). A modulação que intermedia estes fatores é altamente complexa.

A liberação do PAF, detectada durante o período de injúria vascular, foi associada à liberação dos mediadores inflamatórios e à ativação de polimorfonucleares e plaquetas (ZIMMERMAN *et al.*, 1985; D' HUMIÈRES *et al.*, 1986; LEWIS *et al.*, 1988; KUBES *et al.*, 1990b; ZHOU *et al.*, 1992; BAUTISTA & SPITZER, 1992; MINOR & ISSELHARD, 1993; FUKUOKA *et al.*, 1993a; MORENO *et al.*, 1993). Estas intermediações podem ser observadas pelas alterações que acontecem na perfusão tecidual hepática e nas lesões hepatocelulares. A utilização de antagonista específico do PAF em relatos da literatura demonstrou que alterações como necrose celular, aumento das aminotransferases, hipotensão, aumento no níveis de ATP e aumento da lipoperoxidação, podem ser evitadas (ONTELL *et al.*, 1989; FUKUOKA *et al.*, 1993a; TAKADA *et al.*, 1992; ZHOU *et al.*, 1992; FUKUOKA *et al.* 1993b; BOROBIA *et al.*, 1993; MINOR & ISSELHARD, 1993; LIU *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1993; MINOR *et al.*, 1995a; 1995b; SPIEGEL *et al.*, 1995; TAKADA *et al.*, 1995a; 1995b). Em outros relatos houve inibição dos efeitos hipotensores sem redução das aminotransferases (BOIN *et al.*, 1996) e mínimas alterações no fluxo hepático ou na saturação da oxihemoglobina hepática (CHAVEZ-CARTAYA *et al.*, 1994).

As aminotransferases (AST e ALT) são enzimas que, em altas concentrações, são indicativas de lesão hepatocelular apontando alterações de permeabilidade da membrana

citoplasmática (SIMONDS, 1923; REICHLING & KAPLAN, 1988; RADZIUK, 1990; SHERLOCK & DOOLEY, 1993). A fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅) corresponde à fração hepática da mesma, que atua na via glicolítica catalisando a reação reversível do lactato em piruvato. A dosagem do lactato desidrogenase (DHL), por eletroforese, determina qual das frações encontra-se elevada e a sua origem. A enzima DHL₅ é, desta forma, um indicador específico e sensível do tecido hepático lesado (PAPADOPOULOS, 1977; REICHLING & KAPLAN, 1988; CASTRO e SILVA *et al.*, 1992; FERNANDES, 1993).

Observou-se, neste estudo, que a AST elevou-se significativamente após a reperfusão nos subgrupos isquêmicos (A2, B2, A4 e B4) em relação aos seus subgrupos controle. Não houve ação protetora do *WEB 2086* sobre a membrana celular nos subgrupos isquêmicos aos 60 ou 90 minutos (B2 e B4). A enzima ALT também elevou-se significativamente após a reperfusão nos subgrupos isquêmicos (A2, B2, A4 e B4), sendo que aos 15 minutos de reperfusão o subgrupo B4 apresentou elevados níveis enzimáticos, maiores que seu controle e maiores que o subgrupo isquêmico (A4), mostrando que, além de não induzir proteção à membrana celular hepatocítica, a droga *WEB 2086* potencializou os efeitos lesivos nas condições de isquemia/reperfusão. Este mesmo fato foi observado quando se dosou a DHL₅ após 60 minutos de reperfusão. Alguns autores têm demonstrado a ação protetora de alguns antagonistas do *PAF* no fenômeno isquemia/reperfusão com redução do níveis enzimáticos das aminotransferases e da DHL (MINOR & ISSELHARD, 1993; MINOR *et al.*, 1995a e 1995b; RODRIGUE *et al.*, 1995; SPIEGEL *et al.*, 1995). Outros relatos da literatura mostraram que esta redução dos níveis enzimáticos (ALT, AST e DHL) pode estar relacionada à dose utilizada de antagonista específico do *PAF*, ao tempo após a reperfusão (imediato ou tardio), ao tipo de isquemia/reperfusão (contínuo ou intermitente) e à reperfusão realizada em células hepáticas isoladas ou "in vivo". Estes autores, baseados nestes preceitos descritos, demonstraram que ou não houve redução destes níveis enzimáticos, ou esta aconteceu em picos bimodais, sendo o primeiro na quarta hora e o segundo após a vigésima quarta hora após a reperfusão (ONTELL *et al.*, 1989; FUKUOKA *et al.*, 1992; TAKADA *et al.*, 1992; ZHOU *et al.*, 1992; BOROBIA *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993; TAKADA *et al.*, 1995a, 1995b; BOIN *et al.*, 1996).

Sob condições de normalidade, mais de 90% do ATP (adenosina trifosfato) utilizado pelos hepatócitos na realização do trabalho metabólico é produzido pelas mitocôndrias através da fosforilação oxidativa que ocorre na membrana interna da mitocôndria, e é composto por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia de transporte de elétrons (complexos I-IV) e FoF1-ATP sintetase (complexo 5), através de uma série de reações de oxidações e reduções ligadas a NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NADH desidrogenase mitocondrial. Dentro deste processo é gerado um gradiente protônico entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranoso que é utilizado para a síntese de ATP (STRYER, 1992; KRÄHENBÜHL, 1993).

Situações adversas como a isquemia/reperfusão causam danos estruturais e funcionais aos hepatócitos, promovendo a carência de oxigenação tecidual, tornando a mitocôndria uma importante fonte de geração de radicais livres de oxigênio, afetando a fosforilação oxidativa e levando à depleção celular de ATP. Dependendo da extensão da isquemia, pode levar à perda da capacidade de compensação mitocondrial, tornando-se um dano irreversível e, dada a impossibilidade de restaurar a capacidade energética, ocasionar a morte celular (FARBER *et al.*, 1978; MITTNACHT & FARBER, 1981; FATH *et al.*, 1984, 1985; OZAWA, 1992; CASTRO e SILVA *et al.*, 1992; FUJII *et al.*, 1994; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1995).

A ativação das células de Kupffer e neutrófilos, ocasionada pela própria isquemia e reperfusão, pode ser intermediada pelo PAF (LEWIS *et al.*, 1988; KUBES *et al.*, 1990a; ZHOU *et al.*, 1992; SPIEGEL *et al.*, 1995), propiciando a liberação de radicais livres de oxigênio, aumento do influxo de cálcio, principalmente após a reperfusão e redução de seus agentes antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutatona (JAESCHKE & FARHOOD, 1991; LITTAUER & DE GROOT, 1992; GONZÁLEZ-FLECHA *et al.*, 1993; JONES, 1995), levando à diminuição de NADPH e limitando a redução de peróxidos pelo sistema antioxidante de GSH (glutatona) e aumentando a produção de malondialdeído (MDA). A ativação de fosfolipases pode produzir graves danos aos lipídeos das membranas, alterações da permeabilidade mitocondrial, DNA, proteínas, lipídeos e outras macromoléculas (MITTNACHT *et al.*, 1979; FARBER *et al.*, 1981; LUFT, 1995).

Usualmente, quando o tecido hepático é submetido à isquemia, ocorre a diminuição da velocidade de consumo de oxigênio no estado III da respiração mitocondrial e aumento

da velocidade de consumo de oxigênio no estado IV (INOUE & TAGAWA, 1993 e SATOH *et al.*, 1994). Como a razão de controle respiratório (RCR) é o coeficiente do EIII/EIV, as alterações obtidas na RCR vão depender das alterações de EIII e EIV. A velocidade do estado III representa a capacidade de fosforilação mitocondrial (CHANCE & WILLIAMS, 1956) e a diminuição de seus valores pode refletir incapacidade para a compensação mitocondrial (OZAWA, 1992).

No presente trabalho observou-se que após a reperfusão, a velocidade de consumo do estado III da respiração mitocondrial (EIII) dos subgrupos pré-tratados com *WEB 2086* (grupo B) foi mantida em relação a seus subgrupos controle. Os animais que receberam soro fisiológico (grupo A) apresentaram queda nos níveis de EIII aos 15 minutos de reperfusão em relação a seus subgrupos controle. Esta diferença foi observada aos 60 minutos de reperfusão somente nos animais submetidos a 60 minutos de isquemia. Nítida ação protetora do *WEB 2086* sobre EIII foi observada nos animais submetidos a 60 minutos de isquemia após 15 minutos de reperfusão (A2 vs B2). A manutenção do estado III nos animais pré-tratados com *WEB 2086*, nos tempos acima referidos, sugere a integridade da membrana mitocondrial para a produção de energia e capacidade para regeneração das lesões ocorridas no período isquêmico. Este período de 60 minutos de isquemia é considerado curto por alguns autores (GONZÁLEZ-FLECHA *et al.*, 1993).

Nos períodos isquêmicos mais longos, como os de 90 minutos (grupos A3, A4, B3 e B4), observou-se, como relatado na literatura, uma tendência à diminuição do EIII; possivelmente se o tempo de isquemia estudado tivesse sido maior poder-se-ia obter injúria irreversível, provavelmente pela inibição da transferência de elétrons na mitocôndria, conversão de xantina desidrogenase para oxigenase, aumento de radicais livres de oxigênio, inativação das enzimas anti-oxidantes e infiltração neutrofílica (KOBAYASHI *et al.*, 1991 e SATOH *et al.*, 1994).

A velocidade do estado IV da respiração mitocondrial (EIV) representa a respiração basal da mitocôndria, sendo que as alterações ocorridas durante as agressões isquêmicas podem refletir seu consumo basal de oxigênio (CHANCE & WILLIAMS, 1956). No aumento do estado IV ocorre maior consumo de O₂ para a manutenção do potencial de membrana da mitocôndria. Isto pode ser causado pela isquemia e, inicialmente, pode significar uma proteção da mesma contra este dano, na tentativa de manter o potencial de membrana e torná-la apta a produzir ATP quando for estimulada (UYEMURA &

CURTI, 1991; OZAWA, 1992; INOUE & TAGAWA, 1993; SATOH *et al.*, 1994; CRUZ, 1996; RIZZO, 1996).

Os valores de EIV dos animais isquêmicos pré-tratados com WEB (B2 e B4) foram semelhantes aos de seus subgrupos controles (B1 e B3). Este mesmo resultado foi observado nos animais do grupo A (soro fisiológico). Observou-se que aos 15 e 60 minutos após a reperusão o subgrupo B2 apresentou valores de EIV maiores do que A2. Este aumento pode significar perda do potencial de membrana em função do dano causado pela isquemia.

A razão de controle respiratório (RCR) é obtida pela relação entre o estado III e o estado IV (CHANCE & WILLIAMS, 1956). Trata-se de uma medida de grau de acoplamento, ou seja, quão intacta está a membrana mitocondrial e qual a sua capacidade energética após a utilização desta capacidade para sua própria manutenção (CHANCE & WILLIAMS, 1956; OZAWA, 1992).

Os resultados de RCR mostraram que, já no tempo isquêmico (C e R0), o subgrupo controle A2 apresentou valores significativamente menores que seu subgrupo controle A1, porém semelhante ao subgrupo B2 (WEB 2086). Houve uma tendência dos subgrupos isquêmicos apresentarem valores menores de RCR durante o período de isquemia e aos 15 minutos após a reperusão, porém sem significância estatística em relação a seus controles.

O subgrupo A4 apresentou valores menores ao final do tempo de isquemia (R0) que seu subgrupo controle (A3). Os animais submetidos à isquemia de 60 ou 90 minutos e pré-tratamento com WEB 2086 não apresentaram diferença estatisticamente significante em relação a seus controles. Porém, os resultados de RCR foram semelhantes aos animais que receberam soro fisiológico, com exceção do grupo B1 que teve valores menores que o grupo A1 no início do período isquêmico. Isto pode ter acontecido porque o WEB pertence à família dos diazepínicos e, na hora da indução anestésica associado ao stress cirúrgico (NORDSTRÖM *et al.*, 1990), obteve-se um efeito sinérgico temporário com diminuição da função mitocondrial que pode ter sido causado, inclusive, por depressão respiratória dos animais. Esta aparente manutenção da função mitocondrial e da integridade da membrana mitocondrial pode ser devida ao tempo de isquemia, considerado por alguns autores como relativamente curto, pois relatam que a

irreversibilidade da lesão mitocondrial acontece após a segunda e terceira hora de isquemia e é acentuada após os primeiros minutos de reperfusão, quando acontece a maior formação de radicais livres de oxigênio, perda do potencial anti-oxidante existente na própria mitocôndria e depleção do ATP mitocondrial (FARKHOU *et al.*, 1971; KOBAYASHI *et al.*, 1991; GONZÁLEZ-FLECHA *et al.*, 1993; SATOH *et al.*, 1994; JONES, 1995).

Como já citado anteriormente, o *PAF* é considerado um dos mediadores envolvidos na patogênese da lesão da isquemia/reperfusão, por ser liberado pelas células leucocitárias e células de Kupffer, aumentando a adesividade leucocitária aos sinusóides, e por ter sua síntese aumentada na presença de peróxido de hidrogênio. Os neutrófilos e as células de Kupffer podem gerar superóxidos quando a NADPH oxidase é ativada em suas membranas e podem iniciar o processo de lipoperoxidação (MARUBAYASHI *et al.*, 1984; JAESCHKE & FARHOUD, 1991; MEISTER, 1995; TERASHIMA *et al.*, 1996). É possível que o endotélio isquêmico responda à passagem do sangue oriundo da reperfusão, gerando e propiciando a adesão de moléculas às células endoteliais, estimulando os neutrófilos, produção de radicais livres de oxigênio, citocinas e fator de necrose tumoral (TNF).

A lipoperoxidação nas membranas biológicas é um processo destrutivo iniciado por radicais livres de oxigênio (LITTAUER & DE GROOT, 1992; DUTHIE, 1993; SUZUKI *et al.*, 1993; CARACENI *et al.*, 1994; HAMER *et al.*, 1995), causando edema e aumento do influxo de cálcio (NEPOMUCENO *et al.*, 1994 e REED & SAVAGE, 1995) com consequente disfunção mitocondrial pois, uma vez iniciada a condição de isquemia/reperfusão, os radicais H_2O_2 e $OH^\bullet$ podem abrir canais na membrana mitocondrial devido ao ataque a grupos sulfidril (SH) de determinadas proteínas, expostas pela ligação de Ca^{++} ; o aumento deste íon pode ativar a fosfolipase A_2 mitocondrial, induzindo uma maior formação de $OH^\bullet$. Os lipoperóxidos formados podem ser reduzidos por glutathione e alopurinol, vitamina E e alfa-tocoferol (McCORD, 1985; KOBAYASHI *et al.*, 1992; DURMUS *et al.*, 1994).

A glutathione reduzida (GSH) é um antioxidante celular metabolizado na célula pela glutathione peroxidase, que cataliza a conversão de peróxido de hidrogênio para oxigênio e água. Este sistema de redução pela GSH é um dos sistemas que a mitocôndria utiliza para manter-se estável. Durante processos isquêmicos e pós-reperfusionais ocorre perda

da capacidade anti-oxidante mitocondrial e as células tornam-se mais sensíveis aos efeitos da excessiva produção de radicais livres de oxigênio, sendo estas alterações detectadas pelo aparecimento de produtos da lipoperoxidação como o malondialdeído (MDA) e diminuição do conteúdo hepático de GSH mitocondrial (BOUDJEMA *et al.*, 1990; LITTAUER & DE GROOT, 1992; KARWINSKI *et al.*, 1993a; LIU *et al.*, 1994; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1995; NARDO *et al.*, 1996).

Para avaliação da lipoperoxidação foram utilizadas, neste estudo, as dosagens do conteúdo hepático do malondialdeído (MDA) e da glutathiona (GSH). Os valores de MDA diferiram nos subgrupos controle A1 e A3 (soro fisiológico) quando se comparou o período isquêmico ao período de reperfusão; o subgrupo isquêmico A4 apresentou valores maiores após a reperfusão, sendo significativamente maior aos 15 minutos da reperfusão. Após a reperfusão, o grupo pré-tratado com *WEB 2086* apresentou, em geral, valores de MDA menores que o grupo tratado com soro fisiológico porém, sem significado estatístico. Alguns autores (OHKOHCHI *et al.*, 1989; TERASHIMA *et al.*, 1996), relataram que a dosagem de MDA poderia ser questionada para avaliar a detecção de lipoperoxidação e referiram que o hidroperóxido de fosfatidilcolina (PC-OOH) poderia ser considerado mais sensível. CARACENI *et al.* (1994) referiram que houve acentuada liberação de MDA como produto da lipoperoxidação após um período de 150 minutos de isquemia em hepatócitos isolados de ratos, sendo este aumento abolido com o uso de vitamina E.

Encontraram-se poucos relatos na literatura sobre a efetividade do *WEB*, como antagonista específico do *PAF*, coibindo a lipoperoxidação. MINOR & ISSELHARD (1993) relataram que em animais submetidos à isquemia de 60 minutos e reperfusão de 30 minutos, pré-tratados com BN52021 (antagonista específico do *PAF*) observou-se uma moderada mas significativa redução de MDA.

Alguns autores relataram que a avaliação de MDA pelo método do tiobarbiturato pode não representar aumentos na lipoperoxidação, ou que a metabolização do MDA pela aldeído desidrogenase pode acontecer e não necessariamente excluir que tenha ocorrido lipoperoxidação (BREMER *et al.*, 1994; CARACENI *et al.*, 1994). Como a ação protetora do *WEB 2086* não foi claramente evidenciada, pode-se supor que outros métodos para a averiguação da lipoperoxidação tenham que ser utilizados, que o tempo

de isquemia tenha que ser prolongado e que talvez novas doses ou doses maiores de *WEB 2086* tenham que ser empregadas.

Os valores de GSH dos subgrupos isquêmicos dos animais pré-tratados com *WEB 2086* (B2 e B4) e dos animais do grupo que recebeu soro fisiológico (A2 e A4) apresentaram, durante o período isquêmico (C e R0), valores semelhantes. Após 15 minutos de reperfusão houve uma tendência à diminuição dos valores de GSH, sendo que o subgrupo B4 apresentou valores maiores que o subgrupo isquêmico A4 ($p < 0,05$), evidenciando nestes subgrupos que houve lipoperoxidação e ação protetora do *WEB* sobre o conteúdo de GSH mitocondrial. Assim, como foi visto na dosagem do MDA, a dosagem de GSH apresentou, em geral, valores maiores no grupo pré-tratado com *WEB 2086* do que nos subgrupos que receberam soro fisiológico; os grupos submetidos a 90 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão tiveram seus valores de glutathione reduzidos, provavelmente pela ação sinérgica da ação anestésica, lesão de isquemia/reperfusão e perda da capacidade de proteção do *WEB 2086*.

Com a propensão dos subgrupos isquêmicos apresentarem valores maiores de MDA após a reperfusão e valores de GSH menores aos 15 minutos de reperfusão, observou-se que houve lipoperoxidação como relatado por outros autores (MARUBAYASHI *et al.*, 1986; JAESCHKE & FARHOOD, 1991; CARACENI *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1992; LITTAUER & DE GROOT, 1992; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1995; REED & SAVAGE, 1995). A ação protetora do *WEB 2086* sobre a ação do *PAF*, como mediador e modulador da isquemia e reperfusão na avaliação da lipoperoxidação, foi observada nos animais submetidos a 90 minutos de isquemia e 15 minutos de reperfusão. Na literatura há relatos da ação protetora sobre a lipoperoxidação com o uso de α -tocoferol (MARUBAYASHI *et al.*, 1986), γ -glutamylcysteina (KOBAYASHI *et al.*, 1992), CSA e FK 506 (SUZUKI *et al.*, 1993), ubiquinona (MARUBAYASHI *et al.*, 1982) e com TCV 309 (antagonista específico do *PAF*) associado com PGI_2 (NISHIYAMA *et al.*, 1993). Estes autores, utilizando pré-tratamento com TCV 309 e PGI_2 , mostraram que os níveis de GSH de ratos submetidos a 60 ou 120 minutos de isquemia foram significativamente diminuídos em relação ao grupo controle, porém aumentados em relação aos isquêmicos, concluindo que o TCV 309 atenuou o processo oxidativo.

Outros autores demonstraram que algumas drogas que atuam em sítios diversos da modulação da lesão de isquemia/reperfusão não atuam sobre a lipoperoxidação, como o

alopurinol, que é um inibidor do sistema xantina oxidase/desidrogenase, e que impede a degradação de hipoxantina. Referiram que, após a reperfusão, os grupos controle e os submetidos à ação do alopurinol tiveram os níveis de GSH reduzidos à metade. Referiram que a síntese de GSH pode ter sido diminuída durante o período isquêmico e pode ter ocorrido liberação de GSH para o meio extracelular, por necessidade, ou por lesão de membrana, e questionaram o papel da xantina oxidase como indutora da liberação de peróxidos (KARWINSKI *et al.*, 1993b; MEISTER, 1995). Recentemente, SMITH *et al.* (1996) relataram que exames críticos dos estudos realizados com GSH, a despeito das evidências de depleção/oxidação em diversos experimentos, revelaram que as injúrias não podem ser simplesmente relacionadas ao GSH, pois este encontra-se também no meio extracelular, e que estudos delineando esta relação intra e extra-celular deverão ser realizados futuramente. CARACENI *et al.*, em 1994, relataram que a lipoperoxidação segue-se a formação de radicais livres de oxigênio, relacionada principalmente ao aparecimento de H_2O_2 , mas que a lesão dos primeiros minutos causada pela reoxigenação seria devida a formação destes radicais e não à lipoperoxidação.

A geração de H_2O_2 , $OH^\bullet$ e $O_2^\bullet$, durante o período de isquemia/reperfusão, induz alterações funcionais e estruturais nas células endoteliais e na síntese do fator de ativação plaquetária (PAF), que pode ser oriundo das células sinusoidais endoteliais, neutrófilos e células de Kupffer. Após o início da isquemia/reperfusão, uma gama de substâncias (incluindo leucotrienos, PAF, e citocinas) promovem maior adesão dos neutrófilos às células endoteliais, via seletina (GMP-140), moléculas da superfície endotelial (LFA-1, ICAM-1 e ICAM-2) e a administração de um antagonista específico do PAF diminui a adesividade leucocitária, melhora a perfusão sinusoidal e a microcirculação (D' HUMIÈRES *et al.*, 1986; KUBES *et al.*, 1990b; BAUTISTA & SPITZER, 1992; DOWNEY *et al.*, 1995; SPIEGEL *et al.*, 1995).

A avaliação histológica dos fígados submetidos a períodos curtos de até 60 minutos de isquemia mostra congestão centrolobular, vacuolização e discretas áreas de necrose, mostrando que mesmo havendo quantidade razoável de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) no tecido hepático (MARZELLA & GLAUMANN, 1981; POGGETTI, 1987; FREIRE, 1984; HUI *et al.*, 1994) não foi observada correlação com as concentrações de glutathione, nem com a depleção de ATP (JAESCHKE *et al.*, 1990; JAESCHKE & FARHOOD, 1991). Com 90 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão SUZUKI

et al. (1993) observaram congestão sinusoidal interna severa nas zonas periportais e mediozonais e discreto grau de necrose. No estudo realizado com microscopia eletrônica verificaram edema das cristas mitocondriais e pequenas alterações no retículo endoplasmático. A infiltração neutrofílica aos 60 minutos de reperfusão e 60 minutos de isquemia mostrou significativo aumento de PMN em todos os grupos estudados quando comparados aos grupos controles, sendo esta diferença acentuada nos animais que foram pré tratados com CSA e FK 506. As lesões com destruição do espaço de Disse, vacuolização citoplasmática e focos de necrose mais acentuados foram observados em períodos mais tardios (12 ou 24 horas) da reperfusão (EGASHIRA *et al.*, 1992 e LIU *et al.*, 1994). Estes efeitos podem ser inibidos por inibidores diretos ou indiretos (PGE-1, antagonista PAF-específicos) da aderência leucocitária ao endotélio sinusoidal (ONTELL *et al.*, 1989; ZHOU *et al.*, 1992; NISHIYAMA *et al.*, 1993; BOROBIA *et al.*, 1993; NATORI *et al.*, 1996).

As avaliações histológicas deste trabalho foram obtidas nas biópsias hepáticas dos animais do grupo A (soro fisiológico) e do grupo B (WEB 2086), distribuídos nos subgrupos isquêmicos de 60 ou de 90 minutos (A2, A4, B2, e B4) e nos seus respectivos subgrupos controle (A1, A3, B1, e B3), nos tempos pré-isquêmico (C), ao final do tempo de isquemia (R0), após 15 minutos do início da reperfusão (R15) e após 60 minutos do início da reperfusão (R60). No presente trabalho, observou-se necrose nos graus leve e moderado, após o início da reperfusão, em todos os subgrupos. Observou-se o mesmo em relação a presença de PMN nos espaços porta. O grau de acometimento da congestão foi maior após 15 e 60 minutos de reperfusão, em relação ao período isquêmico ($p < 0,05$). Os subgrupos isquêmicos apresentaram maior frequência de congestão de graus moderado e severo em relação aos subgrupos controle, em todos os períodos de isquemia/reperfusão, sendo mais acentuado após o início da reperfusão ($p < 0,001$). O grau de acometimento da vacuolização citoplasmática apresentou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos, ao final do tempo de isquemia (R0) e após 15 minutos do início da reperfusão ($p < 0,005$), nas comparações múltiplas programadas entre os subgrupos A4 e B4 no tempo R0 (grau de acometimento em B4 > A4) e entre os subgrupos B2 e B1 aos 15 minutos de reperfusão (grau de acometimento em B2 > B1).

Apesar das diferenças apresentadas serem estatisticamente significantes em relação aos subgrupos B4 vs A4 e B2 vs B1, estas não delinearam nenhum quadro histopatológico de caráter irreversível e inclusive podem ter sido realizadas leituras nas chamadas áreas "no-reflow", onde ocorreram pouco ou nenhum refluxo após a reperfusão, provavelmente secundário à deterioração da microcirculação hepática. MARZELLA & GLAUMANN, em 1981, relataram, em experimentos com animais submetidos a 60 minutos de isquemia, que mesmo os animais controles mostraram congestão e vacuolização após o período de isquemia e reperfusão. Observaram que as diferenças acentuavam-se quando as biópsias hepáticas eram realizadas após quatro horas de reperfusão, onde observava-se congestão, vacuolização, presença de focos de necrose e infiltração periportal e centrolobular de polimorfonucleares. ZHOU *et al.* (1992), usando WEB 2170 como pré-tratamento para animais submetidos à isquemia hepática seletiva por 60 minutos e estudados com uma e 24 horas após a reperfusão, mostraram que, após uma hora, foi observada congestão leve e, após 24 horas observou-se necrose hepatocítica severa (grupo isquêmico) e moderada (grupo WEB 2170), sem diferença estatística, com infiltração leucocitária mais acentuada ($p < 0,05$) nos grupos isquêmicos controle do que no grupo WEB 2170. Este fato pode sugerir que o *PAF* esteja relacionado também à fase tardia das lesões ocorridas na isquemia/reperfusão.

Estudos realizados em animais submetidos a pré-tratamento com antagonista do *PAF* (TCV 309) mostraram que nos animais isquêmicos controle com 90 minutos de isquemia houve apenas congestão leve, nos de 120 minutos de isquemia houve extensa vacuolização e congestão severa após 60 minutos de reperfusão. O grupo de animais que recebeu a droga antagonista específico do *PAF* apresentou congestão leve e pouca vacuolização (NISHIYAMA *et al.*, 1993). Quando ONTELL *et al.* (1989) utilizaram SRI 63441 como antagonista do *PAF* em fígados isquemiados por 90 minutos e reperfundidos isoladamente por 90 minutos, observaram que tanto os grupos isquêmicos controle como aqueles que receberam pré-tratamento com SRI 63441 apresentaram vacuolização hepatocelular e áreas de necrose focal. Contudo, o grau de injúria pareceu ser menos severo nos animais pré-tratados. BOROBIA *et al.*, em 1993, referiram que animais submetidos a 75 minutos de isquemia hepática seletiva apresentaram, 24 horas após a reperfusão, necrose e infiltração neutrofílica e os animais que foram pré-tratados com BN 52021 tiveram um grau de necrose menor; com 7 dias de reperfusão foi observada vacuolização citoplasmática, sendo a sobrevida dose-dependente.

Em relatos mais recentes, KU *et al.* (1995) e FUKUMOTO *et al.* (1995), procurando o local mais preciso de geração de H_2O_2 e OH° durante a indução de isquemia/reperfusão, removeram os leucócitos do fluxo hepático durante a reperfusão e usaram NBT (nitro blue tetrazolium) para detectar a formação dos radicais livres de oxigênio. O principal local (visto por quimioluminescência) onde ocorreu o depósito do metabólito do corante foi nas células de Kupffer e as alterações enzimáticas de DHL, AST e ALT foram semelhantes, tanto no grupo com depleção leucocitária como no controle. Referiram ainda que as células de Kupffer não se alteraram na presença ou na ausência da infiltração leucocitária e que este mecanismo seria célula de Kupffer-NADPH induzido. Corroborando esta hipótese, relataram que as alterações observadas na microscopia eletrônica foram mais dominantes nas células endoteliais e nas células de Kupffer.

A ligadura do pedículo vascular hepático tem causado hipotensão e diminuição da sobrevivência dos animais em experimentação (STEINER & MARTINEZ, 1961). Quando a ligadura é realizada seletivamente (geralmente oclui-se temporariamente os lobos esquerdo mediano e lateral), observam-se dados contraditórios quanto à ocorrência de hipotensão (MAYES, CONTI, FALLAHZADEH, 1979; SOUZA, *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1994; RIZZO, 1996; BOIN *et al.*, 1996).

O PAF tem sido relatado como um potente mediador inflamatório liberado nas condições de isquemia (STAFFORINI *et al.*, 1990; FUKUOKA *et al.*, 1992, 1993a, 1993b, 1995; TAKADA *et al.*, 1992; MINOR *et al.*, 1995a, 1995b) e com acentuada ação sobre a aderência dos leucócitos às células endoteliais (KUBES *et al.*, 1990a, 1990b). Os distúrbios causados na microcirculação hepática na isquemia/reperfusão são caracterizados por duas fases, isto é, falência na perfusão de capilares (*no-reflow=trombose de microvasos*) e a seqüela que inclui o acúmulo de leucócitos, a interação da célula endotelial com os leucócitos, a migração transendotelial do leucócitos e a perda da integridade endotelial, inclusive com o aumento da leucoquimiotaxia, ativação da seletina e das moléculas que promovem adesividade leucocitária (ICAM-1 e ICAM-2), dentro de segundos após o início da isquemia/reperfusão há liberação de fator de necrose tumoral, leucotrienos, complemento C5a e interleucinas, radicais livres de oxigênio e mediadores lipídicos como o fator de ativação plaquetária (PAF).

Com a continuação da injúria os anti-oxidantes celulares naturais são depletados, o fornecimento de energia hepatocelular esgota-se, e a partir da conversão da xantina para

hipoxantina, perpetua-se a geração de H_2O_2 , $\text{O}_2^\bullet$ e $\text{OH}^\bullet$, levando à perda da integridade endotelial, mitocondrial e consequente morte celular (FILEP & FÖLDES-FILEP, 1993; DOWNEY *et al.*, 1995; MENDER, 1995).

Neste experimento observou-se que os animais submetidos à isquemia hepática seletiva dos lobos esquerdo lateral e mediano apresentaram, em geral, valores de pressão arterial média (PAM) menores aos 15 minutos de reperfusão e que os subgrupos isquêmicos de 90 minutos tiveram valores significativamente menores que seu subgrupo controle (A3) e que o subgrupo pré-tratados com *WEB 2086* (B4). Este subgrupo B4 apresentou valores significativamente menores aos 60 minutos de reperfusão em relação ao início do experimento, mas semelhantes ao período isquêmico e aos 15 minutos de reperfusão. Os valores da pressão venosa central (PVC) apresentaram tendência à diminuição na indução da isquemia/reperfusão, porém diferiram apenas no subgrupo B4 em relação a seu subgrupo controle (B3) e ao isquêmico de 60 minutos (B2). A hipotensão mediada pelo *PAF* e inibida pelos seus antagonistas já foi observada por alguns autores (FUKUOKA *et al.* em 1992, 1993a, b, e 1995; BOIN *et al.*, 1996) e não observada por outros (TAKADA *et al.*, 1992). As alterações na pressão venosa central, apesar da hipotensão induzida pelo *PAF* durante o processo isquêmico, em geral não apresentaram diferença em relação aos subgrupos isquêmicos não-tratados, ou controle (FUKUOKA *et al.*, 1992 e BOIN *et al.*, 1996).

Durante o período isquêmico, altos valores de *PAF* foram dosados por FUKUOKA *et al.* em 1992. A hipotensão induzida durante a instalação do processo isquêmico está relacionada à liberação do fator de ativação plaquetária (*PAF*), como co-participante da cascata inflamatória que acontece nas situações de isquemia/reperfusão, com a liberação de outros mediadores tais como fator de necrose tumoral, endotelinas, leucotrienos, prostaglandinas, radicais livres de oxigênio e fatores que causam adesividade leucocitária (ICAM-1 e ICAM-2). As outras alterações decorrentes ou concomitantes aos distúrbios da microcirculação, foram alteração das enzimas séricas (AST, ALT e DHL), alterações na razão de controle respiratório, lipoperoxidação e alterações morfoestruturais do tecido hepático.

Neste estudo, a hipotensão e a lipoperoxidação (conteúdo de GSH mitocondrial) efetivamente foram inibidas pelo antagonista *WEB 2086*, nos subgrupos submetidos a 90 minutos de isquemia e 15 minutos de reperfusão. Observou-se que este foi o momento

do experimento onde os subgrupos isquêmicos, em relação aos grupos controle, apresentaram maiores valores das aminotransferases e da fração 5 da desidrogenase láctica, grau de congestão mais acentuado, focos de necrose e maior vacuolização citoplasmática. A função mitocondrial no grupo B, em geral, foi mantida em relação aos subgrupos controle e isquêmico do grupo A.

Observou-se a ação do *PAF* como agente hipotensor e indutor da lipoperoxidação durante o período de isquemia e inibido por seu antagonista. As outras alterações bioquímicas não inibidas podem sugerir que a presença do *PAF* intermedia uma modulação na cascata de mediadores inflamatórios, que são liberados durante o período de isquemia/reperfusão. Outra ponderação é que as alterações ocorridas podem ser *WEB 2086*-dose-dependente, e que, o *WEB 2086*, por seu limitado tempo de ação não tenha conseguido inibir as ações ocorridas aos 60 minutos de reperfusão. Como o estudo não prolongou o tempo de reperfusão, não se pode avaliar a ação do antagonista após longos períodos de reperfusão ou em relação a sobrevivência dos animais. Estudos posteriores poderão elucidar uma gama de questões surgidas sobre a dose ideal de *WEB 2086*, momento de administração, efetividade de sua inibição em comparação a outros inibidores específico do *PAF*, sua ação sobre as funções estudadas após longos períodos de isquemia e reperfusão, quais outros parâmetros poderão ser utilizados e quais mediadores poderão ser dosados conjuntamente ou inibidos paralelamente.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que este estudo foi realizado pode-se concluir que:

- A droga *WEB 2086* atuou como inibidor da ação hipotensora do *PAF*, evitando a lipoperoxidação mitocondrial hepática nos animais submetidos a 90 minutos de isquemia e 15 minutos de reperfusão.
- As alterações enzimáticas séricas ocorreram em todos os subgrupos isquêmicos após a reperfusão, independentemente do pré-tratamento realizado com *WEB 2086*.
- Observou-se lesão de desacoplamento mitocondrial (oxidação/fosforilação) nos animais isquêmicos do grupo A após 60 e 90 minutos de isquemia.
- O grau de acometimento histológico de congestão e vacuolização foi maior após a reperfusão em todos os subgrupos isquêmicos, em especial nos animais isquêmicos pré-tratados com *WEB 2086*.

SUMMARY

6. SUMMARY

Temporary hepatic inflow occlusion is one of the essential procedures during liver surgery and liver transplantation. Reperfusion of ischemic tissues is associated with a variety of microvascular changes, including endothelial cell swelling, increased vascular permeability and other alterations in the liver function tests. The platelet-activating factor (*PAF*) is an endogenous lipid-mediator that catalyses various inflammatory processes. It has been shown to be involved in tissue injury after ischemia/reperfusion, when free radicals were released.

The aim of this study was to verify, in Wistar rats, the effectiveness of WEB 2086 (*PAF* antagonist), on preventing the alterations caused by warm partial liver ischemia by clamping the hilar area of the left lateral and medial hepatic lobes during 60 and 90 minutes followed by zero, 15 and 60 minutes of reperfusion.

The study was conducted on 192 male Wistar rats which were divided into two groups. Group A used saline solution and group B used WEB 2086 (10 mg/Kg body weight) five minutes before clamping. No intestinal congestion occurred with this maneuver. The control groups which were submitted to 60 minutes of liver ischemia, were A1 and B1, and the control groups which were submitted to 90 minutes were A3 and B3. The ischemic groups of 60 minutes were A2 and B2 and the ischemic groups of 90 minutes were A4 and B4. Before and after the ischemia (C and R0) and 15 and 60 minutes after the reperfusion (R15 and R60), the plasma AST, ALT, DHL_s, and liver mitochondrial function (III state, IV state and the ratio III/IV=RCR), liver reduced glutathione and (GSH) and malondialdehyde (MDA) and histology analyses were performed. Another 48 animals were submitted to the same procedure and in these rats hemodynamic alterations (medial arterial pressure/MAP and central venous pressure/CVP) were studied.

AST, ALT and DHL_s were markedly increased after reperfusion in all the animals. State III values were more elevated in group B2 than A2 (R15). The same difference occurred in IV state (R15 and R60). The group A2 and A4 showed reduced RCR in comparison to the non-ischemic controls. MDA levels were not different between all the groups, but the GSH levels were seen to be elevated in the group B4 vs A4 after reperfusion (R15). The same results were observed in MAP. CVP levels were increased in group B4 Vs A4.

All groups showed light cell necrosis, cell congestion, reduced neutrophils and vacuolization of the midzonal areas of the lobules mainly after reperfusion.

In conclusion, after 90 minutes of warm ischaemia, WEB 2086 increased GSH levels after reperfusion and medial arterial pressure after 15 minutes of reperfusion. This suggests that warm ischaemia injury is related to the generation of *PAF* and WEB 2086 was most effective in inhibiting hypotension and lipid peroxid in this oxidative stress.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOIM, E.V.; MAGALHÃES, K.A.; LOAYVA, R.J.E.; SOUZA, W.D. - Isquemia hepática e derivação porto-cava - Estudo experimental em cães. Revista do XX Congr. Bras. Cir. Tema livre n.º 684, 1993.
- AGGARWAL, S.; KANG, Y.; FREEMAN, J.; DEWOLF, A.M.; BEGLIOMINI, B. - Is there a post-reperfusion syndrome? Transplant. Proc. 21(3): 3497-3499, 1989.
- ASAKAWA, H.; JEPSSON, B.; MACK, P.; HULTBERG, B.; HAGERSTRAND, I.; BENGMARK, S. - Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. Eur. Surg. Res. 21: 42-48, 1989.
- ATALLA, S.I.; TOLEDO-PEREYRA, L.H.; MACKENZIE, G.H.; CEDERNA, J.P. - Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic liver. Transplantation, 40: 584-89, 1985.
- BACKLUND, W.; STEVENS, T.J.; HAMET, C.H. ; JORDAN, G.L. - Hepatic ischemia in dogs. J.A.M.A., 194(10): 214-216, 1964.
- BAKER, G.L.; CORRY, R.J.;AUTOR, A.P. - Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. Ann Surg., 202: 628-41, 1985.
- BASSI, M. & BERNELLI-ZAZZERA, A. - Ultrastructural cytoplasmic changes of liver cells after reversible and irreversible ischemia. Exp. Mol. Pathol., 3: 332-350, 1964.
- BAUTISTA, A.P. & SPITZER, J.J. - Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. Free Rad. Res. Comms., 17(3): 195-209, 1992.
- BEALS, D. F.; STEDMAN, E.; KOUNS, D.M. - Practical acetate membrane overlay method for multiple sample ldh isoenzyme separation and quantitation. Clin. Chem., 15: 1210-17, 1969.

- BECHSTEIN, W.O.; KLING, N.; GUCKELBERGER, O.; JONAS, S.; NEUHAUS, P. - Risks factors for mortality after hepatic resection. In: CAVALLARI, A.; MAZZIOTTI, A. & PRINCIPE, A. ed. - Liver. Bologna, Monduzzi Editore - International Proceedings Division, 1996. p.397-400. (2nd World Congress International Hepato Pancreato Biliary Association, Bologna, Itália, 1996)
- BENVENISTE, J.; HENSON, P.M.; COCHRANE, C.G. - Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. J. Exp. Med. 136: 1356-1377, 1972.
- BERNELLI-ZAZZERA, A.; CAIRO, G.; SCHIAFFONATI, L.; TACCHINI, L. - Stress protein and reperfusion stress in the liver. Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 120-124, 1992.
- BISMUTH, H.; HOUSSIN, D.; MAZMANIAN, G. - Postoperative liver insufficiency: prevention and management. World J. Surg. 7: 505-510, 1983.
- BLANKESTEIJN, J.D. & TERPSTRA, O.T. - Liver preservation: the past and the future. Hepatology, 13(6): 1235-1250, 1991.
- BOIN, I.F.S.F.; LEONARDI, L.S.; CASTRO E SILVA JR. - Secondary alterations to ischemia/reperfusion injuries after partial hepatic ischemia in Wistar rats using WEB 2086. (2nd World Congress International Hepato Pancreato Biliary Association, Bologna, Itália, 1996). HPB Surgery, 9(Suppl.2): Liver/Oral Presentation: F022, 1996.
- BOROBIA, F.G.; FIGUERAS, J.; ESCRIBA, J.M.; FARRAN, L.; RAFECAS, A.; FABREGAT, J.; TORRAS, J.; JAURRIETA, E. - Platelet-activating factor antagonist BN52021 improves survival in normothermic liver ischemia in rats. Transplant. Proc., 25(4): 2543-2544, 1993.
- BOUDJEMA, K.; VAN GULIK, T.M.; LINDELL, S.L.; VREUGDENHILL, P.S.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F. - Effect of oxidized and reduced glutathione in liver preservation. Transplantation 50 (6): 948-951, 1990.
- BOX, G.E. & COX, D.R. - An analysis of transformations. J. R. Statist. Soc. B, 26: 211-234, 1964.

- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. - Statistics for experiments: An introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons (ed), NY, 1978. p.203-241.
- BRAQUET, P., TONQUI, L., SHEN, T. Y.; VARGAFTIG, B. B. - Perspectives in platelet-activating factor research. Pharmacol. Rev. 39: 97-145, 1987.
- BREMER, C.; BRADFORD, B.U.; HUNT, K.J.; KNECHT, K.T.; CONNOR, H.D.; MASON, R.P.; THURMAN, R.G. - Role of kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. Am. J. Physiol. 267: G630-G636, 1994.
- BULKLEY, G.B. - Endothelial xanthine oxidase: a radical transducer of inflammatory signal for reticuloendothelial activation. Br. J. Surg. 80: 684-6, 1993.
- BULKLEY, G.B. - Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. Br. J. Cancer. 8: 66-73, 1987.
- BULKLEY, G.B. - Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. Lancet, 344(1): 934-936, 1994.
- CALDWELL-KENKEL, J.C.; CURRIN, R.T.; TANAKA, Y.; THURMAN, R.G.; LEMASTERS, J.J. - Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. Hepatology, 13: 83-95, 1991.
- CAMUSSI, G.; TETTA, C.; BUSSOLINO, F.; CALIGARIS-CAPPIO, F.; CODA, R.; MASERA, C.; SEGOLONI, G. - Mediators of immune-complex-induced aggregation of polymorphonuclear neutrophils. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 64: 25-41, 1981.
- CANNON, J.A. Brief report. Transplant. Bull., 3: 7, 1956.
- CARACENI, P.; GASBARRINI, A.; NUSSLER, A.; DI SILVIO, M.; BARTOLI, F.; BORLE, A.B.; VAN THIEL, D.H. - Human hepatocytes are more resistant than rat hepatocytes to anoxia-reoxygenation injury. Hepatology, 20: 1247-1254, 1994.
- CARVALHO, P.L.; LEONARDI, L.S.; MACHADO, M.M.C.; MANTOVANI, M. - Isquemia hepática temporária; estudo do metabolismo glicídico. Rev. Paul. Med. 91: 39-43, 1978.

- CASALS-STENZEL, J. & HEUER, H.O. - Use of *WEB 2086* and *2070* as platelet-activating factor antagonists. Methods Enzymol. 187: 455-465, 1990.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. - Permeabilization on the inner mitochondrial membrane by Ca^{++} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. Free Rad. Biol. Med. 18(3): 479-486, 1995.
- CASTRO E SILVA JR., O. - Função Mitocondrial do Fígado durante a Obstrução Biliar Extra-Hepática e após Drenagem Cirúrgica das Vias Biliares: Efeito da Clorpromazina. Ribeirão Preto, 1986. Tese -Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- CASTRO E SILVA Jr., O.; SOARES, A.F.; ROSELINO, J.E.S. - Hepatic morphology changes after hepatic artery ligation in extrahepatic cholestasis. Braz. J. Med. Biol. Res., 25: 353-355, 1992.
- CASTRO E SILVA, O. Jr.; MIES, S.; BEER, A. Jr.; ROCHA, J. P. S.; RIZZO, C.C.; ZUCOLOTO, S.; CENEVIVA, R.; RAIA, S. - Metabolic changes induced by reperfusion after warm liver ischemia. Acta. Cir. Bras., 11(1): 24-26, 1996.
- CEJALVO,D.; LLORIS-CARSI, TOLEDO-PEREIRA, L.H.; CALVO, M.A. - Effect of adenosine and allopurinol on liver ischemia-reperfusion. Transplant. Proc., 25(6): 3023-3024, 1993.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. - Respiration enzymes in oxidative phosphorylation III. J. Biol. Chem., 217: 409-427, 1956.
- CHANCE, B. - Quantitative aspects of the control of oxygen utilization. In: WOLSTENHOLME, G. E. N. & CONNOR, C.M. (eds). Regulation of Cell Metabolism. 2ª edição. Boston, Editora Little Brown, 1959.
- CHAU, A.Y.S.; GOLDBLOOM, V.C.; GURD, F.N. - Clostridial infection as a cause of death after ligation of the hepatic artery. Arch. Surg., 63: 390-402, 1951.

- CHAVEZ-CARTAYA, R.E.; METCALFE, S.; RAMIREZ-ROMERO, P.; CALNE, R.; JAMIESON, N.V. - Rat liver blood flow after ischemia and reperfusion. The effects of the platelet-activating factor antagonist WEB-2170 and of remove circulating leukocytes. Transplantation, 57(10): 1440-1444, 1994.
- CHAVEZ-CARTAYA, R.E.; PINO-DESOLA, G.; RAMIREZ-ROMERO, P.; CALNE, R.; JAMIESON, N.V. - Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. J. Surg. Res., 60(1): 199-206, 1996.
- CHAZOULLÈRES, O.; BALLEST, F.; LEGENDRE, C.; BONNEFIS, M.T.; REY, C.; CHRÉTIEN, Y.; POUPON, R. - Effect of bile acids on ischemia-reperfusion liver injury. J. Hepatology, 13: 318-322, 1991.
- CHIEN, K.R. & FARBER, J.L. - Microsomal membrane dysfunction in ischemic rat liver cells. Arch. Biochem. Biophys., 180: 191-198, 1977.
- CHIEN, K.R.; ABRAMS, J.; PFAU, R.G.; FARBER, J.L. - Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. Am. J. Pathol., 88: 539-558, 1977.
- CHILTON, F.H.; O'FLAHERTY, J.T.; WALSH, C.E.; THOMAS, R.L.; DECHATELET, L.R.; WAITE, B.M. - Platelet-activating factor. Stimulation of the lipoxygenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. J. Biol. Chem. 257: 5402-5403, 1982.
- CLAVIEN, P.A.; HARVEY, P.R.C.; STRASBERG, S.M. - Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: and overview and synthesis of current studies. Transplantation, 53: 957-978, 1992.
- CONOVER, W.J. - Practical nonparametric statistics. John Wiley & Sons (ed), NY, 1971. p.203-357.
- CONTE, J.V.Jr; KATZ, N.M.; WALLACE, R.B.; FOEGH, M.L. - Long-term lung preservation with the PAF antagonist BN 52021. Transplant. Proc. 51(6): 1152-1156, 1991.

- CRAFA, F.; GUGENHEIN, J.; SAINT-PAUL, M.C.; CAVANEL, C.; LAPALUS, F.; OUZAN, D.; MILITERNO, G.; MOUIEL, J. - Protective effects of prostaglandin E1 on normothermic liver ischemia. Eur. Surg. Res., 23 (5-6): 278-284, 1991.
- CRUZ, C.A.T. - Alterações metabólicas do fígado após diferentes tipos de reperfusão do enxerto ortotópico de fígado em cães. Tese-Doutorado- Ribeirão Preto, 1996. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- D'HUMIÈRES, S.; RUSSO-MARIE, F.; VARGAFTIG, B.B. - PAF-acether-induced synthesis of prostacyclin by human endothelial cells. Eur. J. Pharmacol., 131: 13-19, 1986.
- DE GROOT, H.- Reactive oxygen species in tissue injury. Hepato-Gastroenterol. 41: 328-332, 1994.
- DEL MAESTRO, R.F. - An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol. Scand., 492: 153-167, (Suppl)1980.
- DOWDY, S. & WEARDEN, S. - Statistics for Research. John Wiley & Sons (ed), 2ªed., NY, 1985. p.303-312.
- DOWNEY, G.P.; FIALKOW, L.; FUKUSHIMA, T. - Initial interaction of leukocytes within the microvasculature: deformability, adhesion, and transmigration. New Horizons, 3(2): 219-228, 1995.
- DURMUS, O.; ARICIOGLU, A.; GUVEN, T.; OGUZ, M.; YEL, M.; TURKOZKAN, N. - The effect of allopurinol on the liver ultrastructure, reduced glutathione and lipid peroxide levels during liver ischemia in guinea pigs. Gen. Pharmacol., 25(4): 781-786, 1994.
- DUTHIE, G.G. - Lipid peroxidation. Eur. J. Clin Nutr 47: 759-764, 1993.
- EGASHIRA, T.; KUDO, Y.; MURAYAMA, F.; GOTO, S.; KONO, T.; TAKAYAMA, F.; YAMANAKA, Y. - An injury of the liver caused by ischemia-reperfusion in rat liver. Report 2. Nippon-Yakurigaku-Zasshi, 100(5): 445-451, 1992.

- ESTEBAN, F.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, J.; MARTIN, C.; RUIX, J.C.; NUVAIS, X.; GARCIA-ALLUT, J.L.; SAURI, R.; MURIO, J.E.; MOURELLE, M.; SEGURA, R.M.; MORA, A.; PERACAULA, R.; MARGARIT, C.; SALGADO, A. - Nitric Oxide and hepatic ischemia injury in human orthotopic liver transplantation. Transplant. Proc. 27(4): 2283-2285, 1995.
- EZAKI, T.; SEO, Y.; TOMODA, H.; FURUSAWA, M.; SUGIMACHI, K. - Partial hepatic resection under intermittent hepatic inflow occlusion in patients with chronic liver disease. Br. J. Surg. 79: 224-226, 1992.
- FARBER, J.L.; CHIEN, K.G.; MITTNACHT, S.M. - Pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. Am. J. Pathol., 102: 271-281, 1981.
- FARBER, J.L.; MARTIN, J.T.; CHIEN, R. - Irreversible ischemic cell injury. Prevention by chlorpromazine of the aggregation of the intramembranous particles rat liver plasma membranes. Am. J. Pathol., 92: 713-723, 1978.
- FARKHOU, E.F.; DANIEL, A.M.; BEAUDOIN, J.G.; MACLEAN, L.D. - Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia. Surg. Gynecol. Obstet., 132: 832-838, 1971.
- FARO, R.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; DONATO, J.L.; BOIN, I.; OPGENORTH, T.J.; WITHRINGTON, P.G.; ZATZ, R.; ANTUNES, E.; De NUCCI, G. - Role of endothelin ETA and ETB receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. J. Cardiovasc. Pharmacol. 26(Suppl.3): S204-S207, 1995.
- FATH, J.J.; ASCHER, N.L.; KONSTANTINIDES, F.K.; BLOOMER, J.; SHARP, H.; NAJARIAN, J.S.; CERRA, F.B. - Metabolism during hepatic transplantation indicators of allograft function. Surgery, 96: 664-674, 1984.
- FATH, J.J.; CYR, J.A.S.; KONSTANTINIDES, F.N.; ALDEN, P.; ASCHER, N.L.; BIANCO, R.W.; FOKER, J.E.; CERRA, F.B. - Alterations in amino acid clearance during ischemia predict hepatocellular ATP changes. Surgery, 98: 396-404, 1985.

- FELIP, P.I.; HOTTER, G.; CLOSA, D.; ROSELLÓ-CATAFAU, J.; BULBENA, O.; BADOSA, F.; MORRIS, M.; FERNÁNDEZ-CRUZ, L.; GELPI, E. - Effect of a platelet-activating factor antagonist and desferrioxamine administration on eicosanoid production in rat pancreas transplantation. Transplantation, 57(1): 12-17, 1994.
- FERNANDES, L.P.- Alterações hepatocelulares com diferentes concentrações de glicogênio hepático durante isquemia normotérmica e após reperfusão do fígado, em cães. Ribeirão Preto, 1993. Tese-Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- FILEP, J.G. & FÖLDES-FILEP, E. - Modulation by nitride oxide of platelet-activating factor-induced albumin extravasation in the conscious rat. Br. J. Pharmacol., 110: 1347-1352, 1993.
- FLETCHER, J.R.; DISIMONE, A.G.; EARNEST, M.A. - Platelet activating factor receptor antagonist improves survival and attenuates eicosanoid release in severe endotoxemia. Ann. Surg., 211(3): 312-316, 1990.
- FREDERIKS, W.M.; KOOIJ, A.; BOSCH, K.S. - Role of xanthine oxidase activity in tissue damage of rat liver after ischemia. Transplant. Proc. 27(5): 2855-2856, 1995.
- FREEMAN, B.A. & CRAPO, J.D. - Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest., 47: 412-26, 1982.
- FREIRE, M.A. - Isquemia hepática seletiva - estudo experimental em ratos - alterações macro e microscópicas - mortalidade. Rio de Janeiro, 1994. Tese -Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro,
- FUJII, Y.; JOHNSON, M.E.; GORES, G.J. - Mitochondrial dysfunction during anoxia/reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. Hepatology, 20: 177-185, 1994.
- FUKUMOTO, T., KU, Y.; KURODA, Y.; SAITOH, Y. - Identification of primary source of oxygen radicals in hepatic reperfusion injury: use of novel leucocyte removal system and nitro blue tetrazolium perfusion. Transplant. Proc. 27(2): 1901-1905, 1995.

- FUKUOKA, T.; NAKAJIMA, Y.; HORIKAWA, M.; AOMATSU, Y.; YOSHIMURA, A.; UENO, M.; KO, S.; NAKANO, H. - Platelet-activating factor mediates systemic circulating collapse after temporary inflow occlusion. Transplant. Proc. 25(2): 1809-1810, 1993a.
- FUKUOKA, T.; NAKAJIMA, Y.; NAKANO, H. - Platelet-activating factor as a vasodepressive mediator of liver ischemia. Transplant. Proc. 25(6): 3225-3227, 1993b.
- FUKUOKA, T.; NAKAJIMA, Y.; NAKANO, H. - The platelet activating factor as a pivotal mediator of shock after liver ischemia. Surg. Today, 25(4): 351-356, 1995.
- FUKUOKA, T.; NAKAJIMA, Y.; NAKANO, H.; KENMOCHI, T.; HAYASHI, R.; SUZUKI, S.; AMEMIYA, H. - Experimental study on platelet-activating factor and systemic circulatory failure caused by ischemic liver. Nippon-Geka-Gakkai-Zasshi, 93(12): 1474-1480, 1992.
- FULLER, B.J.; GOWER, J.D.; GREEN C.J. - Free radical damage and organ preservation: fact or fiction? Cryobiology, 25: 377-393, 1988.
- FUSAOKA, T.; HUNT, K.J.; LEMASTERS, J.J.; THURMAN, R.G. - Evidence that activation of Kupffer cells increases oxygen uptake after cold storage. Transplantation, 58: 1067-1071, 1994.
- GARCÍA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MORALES, A.; KAPLOWITZ, N.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. - Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor- κ B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. Mol. Pharmacol. 48: 825-834, 1995.
- GAYUMI, A.K.; JAMIESON, W.R.; POOSTIZADEH, A. - Effects of platelet-activating factor antagonist CV 3988 in preservation of heart and lung for transplantation. Ann. Thorac. Surg. 52(4): 1026-1032, 1991.

- GODFROID, J.J.; BROQUET, C.; JOUQUEY, S.; LEBRAR, M.; HEYMANS, F.; REDEUILH, C.; STEINER, E.; MICHEL, E.; COEFFIER, E.; FICHELE, F.; WORCEL, M. - Structure-activity relationship in *PAF*-acether. 3. Hydrophobic contribution to agonist activity. J. Med. Chem. 30: 792-797, 1987.
- GONZALEZ-CRUSSI, F. & SHUEH, W.- Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. Am. J. Pathol. 112:127-35, 1983.
- GONZALEZ-FLECHA, B.; CUTRIN, J.C.; BOVERIS, A. - Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. J. Clin. Invest., 91: 456-64, 1993.
- GORES, G.J.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. - Plasma, membrana bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. Hepatology, 11: 690-698, 1990.
- GORES, G.J.; NIEMINEN, A.L.; FLEISHMAN, K.E.; DAWSON, T.L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. - Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. Am. Physiol. Soc.: C315-C322, 1988.
- GORLA, N.; FERREYRA, E.C.; VILLARRUEL, M.C.; FENOS, O.M.; CASTRO, J.A. - Studies on the mechanisms of glutathione prevention of carbon tetrachloride-induced liver injury. Br. J. Exp. Pathol., 64: 388-395, 1983.
- GOTOH, M.; MONDEN, M.; SAKON, M.; KANAI, T.; UMESHITA, K.; NAGANO, H.; TAKESADA, M. - Hilar lobar vascular occlusion for hepatic resection. J. Am. Coll. Surg. 178: 6-10, 1994.
- GRACE, P.A. - Ischemia-reperfusion injury. Br. J. Surg., 81: 637-647, 1994.
- GRANGER, D.N.; McCORD, J.M.; PARKS, D.A.; HOLLWARTH, M.E.- Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. Gastroenterology, 90: 80-4, 1986.
- GRANGER, D.N.; RUTILI, G.; McCORD, J.M. - Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology 81: 22-29, 1981.

- HABERER, H. - Arch. F. Klinisch Chirurgie, 78: 557, 1906.
- HAMAZAKI, K.; YAGI, T.; INAGAKI, M.; TANAKA, N.; MIMURA, H.; ORITA, K.;
LYGIDAKIS, N.J. - Hepatectomy under extracorporeal circulation. Surgery,
118(1): 98-102, 1995.
- HAMER, I.; WATTIAUX, R.; WATTIAUX-DE-CONINCK, S. - Deleterious effects of
xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after ischemia/reperfusion. Biochim.
Bophys. Acta. 1269(2): 145-52, 1995
- HANAZAKI, K.; KURODA, T.; HABA, Y.; SHIOHARA, E.; KAJIKAWA, S.; IIDA,
F. - Protective effect of the thromboxane A2 receptor antagonist ONO 3708 on
ischemia-reperfusion injury in the dog liver. Surgery. 116(5): 896-903, 1994.
- HANNOUN, L.; DELVA, E.; RIBEIRO, J.; BORIE, D.; BALLADUR, P.; CAMUS, Y.;
HÖNIGER, J.; LEVY, E.; PARC, R. - Les limites des hepatectomies. Rev. Col.
Bras. Cir. XX (Suppl.): 1-5, 1993.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that
gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: 422-427, 1972.
- HASSELGREN, P.O. - Prevention and treatment of ischemia of the liver. Collective
review. Surg. Gynecol. Obstet., 164: 187-196, 1987.
- HEFFRON, T.G. & EMOND, J.C. - Living related donor liver transplantation. In:
MADDREY, W.C. & SORRELL, M.F., ed. Transplantation of the liver. 2nded.,
Norwalk, Appleton & Lange, 1995. p.97-106.
- HENRY, J. R.; CHIAMORI, N.; GOLUB, O. J.; BERKMAN, S. - Revised
spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic
transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. Am. J.
Clin. Pathol., 34(4):381-398, 1960.
- HENSON, P.M. - Bioassay of platelet-activating factor by release of (3H) serotonin.
Methods Enzymol. 187: 130-134, 1990.

- HIGGINS, G.M. & ANDERSON, R.M. - Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 12: 186-202, 1931.
- HISAMA, N.; YAMAGUCHI, T.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; MURAKAMI, K.; MORI, K.; YAMADA, S.; OGAWA, M. - Anticoagulant pretreatment attenuates production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion of rat liver. Dig. Dis. Sci., 41(7): 1481-1486, 1996.
- HOAGLIN, D.C.; MOSTELLER, F.; TUKEY, J.W. - Fundamentals of exploratory analysis of variance. John Wiley & Sons (ed), NY, 1991. p. 183-351.
- HOCHBERG, Y. & TAMHANE, A.C. - Multiple comparisons procedures. John Wiley & Sons (ed), NY, 1987. p.363-372.
- HOGEBOM, G. H.; SCHNEIDER, W. C.; PALLADE, G. E. - Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. Biol. Chem., 172: 619-630, 1948.
- HOURLANI, S.M.O. & CUSACK, N.J. - Pharmacological receptors on blood platelets. Pharmacol. Rev. 43(4): 243-298, 1991.
- HSUEH, W.; GONZALEZ-CRUSSI, ARROYAVE, J.L. - Release of leukotriene C4, by isolated perfused rat small intestine in response of platelet-activating factor. J. Clin. Inv. 78: 108-114, 1986.
- HUGHES, B.P.; MILTON, S.E.; BARRITT, G.J.; AULD, A.M. - Studies with verapamil and nifedipine provide evidence for the presence in the liver cell plasma membrane of two types of Ca²⁺ inflow transporter which are dissimilar to potential-operated Ca²⁺ channels. Biochem. Pharmacol. 35: 3045-3052, 1986.
- HUGUET, C.; GAVELLI, A.; BONA, S.- Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. J. Am. Coll. Surg. 178: 454-458, 1994.
- HUGUET, C.; STIPA, F. & GAVELLI, A. - Extended left hepatectomy with vascular exclusion. J. Am. Coll. Surg. 178: 288-292, 1994.

- HUI-A.; KAWASAKI, S.; MAKUUCHI, M.; NAKAYAMA, J.; IKEGAMI, T.; MIYAGAWA, S. - Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. Hepatology, 20: 1287-1293, 1994.
- HWANG, S.B. - Competitive inhibition of tritium-labelled platelet-activating factor binding to rabbit platelet membranes by amiloride and amiloride analogs. Biochem. Biophys. Res. Commun., 163: 165-171, 1989.
- HWANG, S.B.; LAM, M.H.; CHANG, M.N.- Specific binding of (3H) dihydrokadsurenone to rabbit platelet membranes and its inhibition by the receptor agonists and antagonists of platelet-activating factor. J. Biol. Chem. 261: 13720-13726, 1986.
- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. - The mechanisms and significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI₂) from endothelial cells. Wien. Klin. Wochenschr. 103/14: 422-434, 1991.
- HYSLOP, S. & DE NUCCI, G. - Vasoactive mediators released by endothelins. Pharmacol. Res. 26(3): 223-242, 1992.
- INOUE, T. & TAGAWA, K. - Mitochondrial dysfunction in ischemic organs. In: Methods in Toxicology, vol (2) - Mitochondrial Dysfunction. eds. LH LASH & JONES, D.P., Academic Press, CA, USA, 1993, p.162
- JAESCHKE, H. & FARHOOD, A. - Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. Am. J. Physiol., 260: G355-G362, 1991.
- JAESCHKE, H.; FARHOOD, A.; SMITH, C.W. -Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion in rat liver in vivo. FASEB J. 4: 3355-3359, 1990.
- JONES, D.P. - Mitochondrial dysfunction during anoxia and acute cell injury. Biochim. Biophys. Acta. 1271: 29-33, 1995.
- KAMIKE, W.; BURDELSKI, M.; STEINHOFF, G.; RINGE, B.; LAUCHART, W.; PICHLMAYR, R. - Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. Transplantation, 45: 138-143, 1988.

- KARWINSKI, W.; BOLANN, B.; ULVIK, R.; FARSTAD, M.; SOREIDE, O. - Normothermic liver ischemia in rats: xanthine oxidase is not the main source of oxygen free radicals. Res. Exp. Med. Berl., 193(5): 275-283, 1993a.
- KARWINSKI, W.; FARSTAD, M.; ULVIK, R.; SOREIDE, O. - Sixty-minute normothermic liver ischemia in rats. Evidence that allopurinol improves liver cell energy metabolism during reperfusion but that timing of drug administration is important. Transplantation, 52(2): 231-234, 1991.
- KARWINSKI, W.; GARCIA, R.; HELTON, WS. - Protective effects of the calcium channel blocker verapamil on hepatic function following warm ischemia. J. Surg. Res., 64(2): 150-155, 1996.
- KARWINSKI, W.; ULVIK, R.; FARSTAD, M.; SVARDAL, A.; BERGE, R.; SOREIDE, O. - Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. Eur. J. Surg. 159: 355-359, 1993b.
- KAWAMURA, E.; YAMANAKA, N.; OKAMOTO, E.; TOMODA, F.; FURUKAWA, K. - Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. Hepatology, 21(4): 1138-1143, 1995.
- KAWANO, K.; KIM, Y.; KAI, T.; ISHII, T.; TATSUMA, T.; MORIMOTO, A.; TAMURA, Y.; KOBAYASHI, M. - Evidence that FK506 alleviates ischemia/reperfusion injury to the rat liver: in vivo demonstration for suppression of TNF- α production in response to endotoxemia. Eur. Surg. Res., 26(2): 108-115, 1994.
- KELLOGG, E.W. & FRODOVICH, I. - Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J. Biol. Chem. 250 (22): 8812-8817, 1975.
- KIM, Y.I.; ISHII, T.; ARAMAKI, M.; NAKASHIMA, K.; YOSHIDA, T.; KOBAYASHI, M. - The Pringle maneuver induces only partial ischemia of the liver. Hepato-Gastroenterol., 42(2): 169-171, 1995.

- KOBAYASHI, H.; KUROKAWA, T.; KITAHARA, S.; NONAMI, T.; HARADA, A.; NAKAO, A.; SUGIYAMA, S.; OZAWA, T.; TAKAGI, H. - The effects of γ -glutamylcysteyne ethyl ester a prodrug of glutathione on ischemia-reperfusion induced liver injury in rats. Transplantation, 54(3): 414-418, 1992.
- KOBAYASHI, H.; NONAMI, T.; KUROKAWA, T.; SUGIYAMA, S.; OZAWA, T.; TAKAGI, H. - Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. J. Surg. Res., 51(3): 240-244, 1991.
- KOBAYASHI, H.; NONAMI, T.; KUROKAWA, T.; TAKEUCHI, Y.; HARADA, A.; NAKAO, A.; TAKAGI, H. - Role of endogenous nitric acid oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. J. Surg. Res., 59(6): 772-779, 1995.
- KOO, A.; KOMATSU, H.; TAO, G.; INOUE, M.; GUTH, P.H.; KAPLOWITZ, N. - Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. Hepatology, 15: 507-514, 1992.
- KORNECKI, E.; EHRLICH, Y.H.; LENOX, R.H. - Platelet-activating factor induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines. Science, 226: 1454-1456, 1984.
- KOYAMA, I.; BULKLEY, G.P.; WILLIAMS, G.M.; IM, M.J. - The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. Transplantation 40: 590-595, 1985.
- KOZAKI, K.; MATSUNO, N.; KOZAKI, M. - Beneficial effects of pentoxifylline and propentofylline on preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. Transplant. Proc. 28(1): 333-334, 1996.
- KRÄHENBÜHL, S. - Alterations in mitochondrial functions and morphology in chronic disease: Pathogenesis and potential for therapeutic intervention. Pharmac. Ther. 60: 1-38, 1993.

- KU, Y.; TOMINAGA, M.; FUKUMOTO, T.; NISHIDA, T.; MAEDA, I.; KITAGAWA, T.; KURODA, Y.; SAITOH, Y. - Evaluation of role of leukocytes in hepatic reperfusion injury using a novel leukocyte removal system and nitro blue tetrazolium perfusion. Transplant. Proc. 27(1): 718-20, 1995.
- KUBES, P.; IBBOTSON, G.; RUSSELL, J.; WALLACE, J.L.; GRANGER, N. - Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. Am. J. Physiol. 259: G300-G305, 1990a.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, N. - Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: role of adherent leukocytes. Am. J. Physiol. 258: G158-G163, 1990b.
- KUDO, Y.; EGASHIRA, T.; TAKAYAMA, F.; YAMANAKA, Y.; SHIMADA, T. - Investigation of the renal injury caused by liver ischemia-reperfusion in rats. Arch. Toxicol. 67(7): 502-529, 1993.
- KUNZ, R.; SCHOENBERG, M.H.; BUCHLER, M.; JOST, K.; BEGER, H.G. - Oxygen radicals in liver ischemia and reperfusion- experimental data. Klin. Wochenschr. 69(21-23): 1095-1098, 1991.
- KURITA, K.; TANABE, G.; AIKOU, T.; SHIMAZU, H. - Inhibition of the increase of intrahepatic Ca^{2+} by diltiazem in rats with liver ischemia. J. Hepatol. 21: 567-571, 1993.
- KUROKAWA, T.; KOBAYASHI, H.; NONAMI, T.; HARADA, A.; NAKAO, A.; SUGIYAMA, S.; OZAWA, T.; TAKAGI, H. - Beneficial effects of cyclosporine on postischemic liver injury in rats. Transplantation, 53(2): 308-311, 1992.
- KUROKAWA, T.; NONAMI, T.; HARADA, A.; NAKAO, A.; SUGIYAMA, S.; OZAWA, T.; TAKAGI, H. - Effects of prostaglandin E1 on the recovery of ischemia-induced liver mitochondrial dysfunction in rats with cirrhosis. Scand. J. Gastroenterol. 26(3): 269-274, 1991.

- LAFFI, G.; CARLONI, V.; BALDI, E.; ROSSI, M.E.; AZZARI, C.; GRESELE, P.; MARRA, F.; GENTILINI, P. - Impaired superoxide anion, platelet-activating factor and leukotriene B₄ synthesis by neutrophils in cirrhosis. Gastroenterology 105(1): 170-177, 1993.
- LEHR, H.A.; GUHLMANN, A.; NOITE, D.; MESSMER, K. - Leukotrienes as mediator in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the Hamster. J. Clin. Invest. 87: 2036-2041, 1991.
- LEWIS, M.S.; WHATLEY, R.E.; CAIN, P.; MCINTYRE, PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. - Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. J.Clin. Invest. 82: 2045-2055, 1988.
- LI, X., MATIN, A.F.M.; SUZUKI, H.; UNO, T.; YAMAGUCHI, T.; HARADA, Y. - Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. Transplantation, 56: 1331-1336, 1993.
- LIN, A.H.; MORTON, D.R.; GORMAN, R.R.- Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 70: 1058-1059, 1982.
- LINDELL, S.; AMETANI, M.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - Hypothermic perfusion of rabbit livers: effect of perfusate composition (Ca⁺⁺ and lactobionate) on enzyme release and tissue swelling. Cryobiology 26: 407-412, 1989.
- LITTAUER, A. & DE GROOT, H. - Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. Am. J. Physiol. 262 (25): *G1015-1020, 1992.
- LIU, P.T.; SYMONS, M.; HOWARTH, J.A.; BOULTER, P.S.; PARKE, D.V. - Studies in surgical trauma: Oxidative stress in ischemia-reperfusion on rat liver. Clinical Science 86: 453-460, 1994.
- LIU, T.; WALSH, T.R.; NALESNIK, M.; MAKOWKA, L.- Improved preservation of the rat liver for orthotopic liver transplantation use of University of Wisconsin lactobionate solution retrograde reflusing. Surgery, 108(5): 890-897, 1990.

- LUFT, R. - The development of mitochondrial medicine. Biochim. Biophys. Acta 1271: 1-6, 1995.
- MARKOWITZ, J. - The hepatic artery. Surg. Gynecol. & Obstet., 95: 644-646, 1952.
- MARKOWITZ, J.; ARCHIBALD, J.; DOWNIE, H.G. - Surgery of the liver. In: Experimental Surgery - NY, 1965, 507-562.
- MARKOWITZ, J.; RAPPAPORT, A.; SCOTT, A.C. - The function of the hepatic artery in the dog. Am. J. Digest. Dis., 16: 344-348, 1949.
- MAROTTO, M.E.; THURMAN, R.G.; LEMASTERS, J.L. - Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: Protection by allopurinol. Hepatology, 8(3): 585-590, 1988.
- MARSH, D.C.; LINDELL, S.L.; FOX, L.E.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - Hypothermic preservation of hepatocytes. 1. Role of cell swelling.- Cryobiology, 26: 524-534, 1989.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; EZAKI, H.; HAYASHI, K.; KAWASAKI, T. - Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ₁₀. Surgery, 91(6): 631-637, 1982.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; OCHI, K.; KAWASAKI, T. - Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by α -tocopherol administration. Surgery, 99: 184-191, 1986.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; YAMADA, K.; KAWASAKI, T. - Changes in the levels of endogenous coenzyme Q homologs, α -tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion and the effect of pretreatment with coenzyme Q₁₀. Biochem. Biophys. Acta., 797: 1-9, 1984.
- MARUJO, W.C. - Depleção de glutatona e tolerância hepática à isquemia e reperfusão. São Paulo, 1995. Tese - Doutorado- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

- MARZELLA, L. & GLAUMANN, H. - Effects in vivo liver ischemia on microsomes and lysosomes. Virchows Arch (Cell Pathol.) 36: 1-25, 1981.
- MARZI, I.; ZHI, Z.N.; ZIMMERMANN, F.A.; LEMASTERS, J.J.; THURMAN, R.G. - Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. Transplant. Proc., 21: 1319-1320, 1989.
- MATIM, A.F.M.; SUZUKI, H.; UNO, T.; YAMAGUCHI, T.; HARADA, Y. - Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. Transplantation, 56: 1331-1336, 1993.
- MAYES, E.T.; CONTI, S.; FALLAHZADEH, H. - Hepatic artery ligation. Surgery, 86(4): 536-543, 1979.
- MCCORD, J. M. - Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med., 312: 159-163, 1985.
- MCINTYRE, D.E. & POLLOCK, W.K. - Platelet-activating factor stimulates phosphatidylinositol turnover in human platelets. Biochem. J., 212: 433-437, 1983.
- McKEOWN, C.M.B.; EDWARDS, V.; PHILLIPS, M.J.; HARVEY, P.R.C.; PETRUNKA, C.N.; STRASBERG, S.M. - Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. Transplantation, 46: 178-191, 1988.
- MEHRABI, A.; KRAUS, T.W.; KLAR, E.; FERNANDES, L.; OSSWALD, B.R.; AULMANN, M.; GEBHARD, M.M.; OTTO, G. - Analysis of extravascular endothelin levels in UW solution and rinsing effluent of porcine liver grafts after cold storage. Transplant. Proc., 27(5): 2613-2615, 1995.
- MEISTER, A. - Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. Biochim. Biophys. Acta 1271: 35-42, 1995.
- MENGER, M.D. - Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. Transplant. Proc., 27(5): 2863-2865, 1995.

- METZGER, J. & LAUTERBURG, B.H. - Postischemic ATP levels predict hepatic function 24 hours following ischemia in the rat. Experientia, 44(5): 455-457, 1988.
- MINOR, T. & ISSELHARD, W. - Platelet-activating factor antagonism enhances the liver's recovery from warm ischemia in situ. J. Hepatol., 18(3): 365-368, 1993.
- MINOR, T.; ISSELHARD, W. ; YAMAGUCHI T. - Involvement of platelet activating factor in microcirculatory disturbances after global hepatic ischemia. J. Surg. Res., 58(5): 536-540, 1995b.
- MINOR, T.; YAMAGUCHI T.; ISSELHARD, W. - Treatment of preservation/reperfusion injury by platelet-activating factor antagonis in the rat liver graft. Transplant. Proc., 27(1): 522-523, 1995a.
- MITTNACHT JR, S. & FARBER, J.L. - Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. J. Biol. Chem. 256(7): 3199-3206, 1981.
- MITTNACHT JR, S.; SHERMAN, C.S.; FARBER, J.L. - Reversal of ischemia mitochondrial dysfunction. J. Biol. Chem., 254(19): 9871-9878, 1979.
- MONDEN, M. & FORTNER, J.G. - 24 and 48-hour canine liver preservation by simple hypothermia with prostacyclin. Ann Surg. 196: 38-42, 1982.
- MORENO, P.; GIJON, M.A.; FRADERA, R.; FABREGAT, J.; RAFECAS, A.; BIONDO, S.; FIGUERAS, J.; SÁNCHEZ-CRESPO, M.; JAURRIETA, E. - Changes in peripheral blood levels of platelet-activating factor after orthotopic liver transplantation. Transplant. Proc. 25(4): 2642-2643, 1993.
- MOUSSA, M.E.; ISLA, A.M.; SARRAF, C.E.; UEMOTO, S.; SAWADA, H.; HABIB, N.A. - Effect of total vascular exclusion during liver resection on hepatic ultrastructure. In: CAVALLARI, A.; MAZZIOTTI, A. & PRINCIPE, A. ed. - Liver. Bologna, Monduzzi Editore - International Proceedings Division, 1996. p.405-409. (2nd World Congress International Hepato Pancreato Biliary Association, Bologna, Itália, 1996)

- MOY, J.A.; BATES, J.N.; FISHER, R.A. - Effects of nitric oxide on platelet-activating factor and alpha-adrenergic-stimulated vasoconstriction and glycogenolysis in the perfused rat liver. J. Biol. Chem. 266(13): 8092-8096, 1991.
- NAGASUE, N.; UCHIDA, M.; KUBOTA, H.; HAYASHI, T.; KOHNO, H.; NAKAMURA, T. - Cirrhosis livers can tolerate 30 minutes ischemia at normal environmental temperature. Eur. J. Surg., 161:181-186, 1995.
- NAKAMURA, S.; NISHIYAMA, R.; SERIZAWA, A.; YOKOI, Y.; SUZUKI, S.; KONNO, H.; BABA, S.; MURO, H. - Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. Transplantation, 59: 679-684, 1995.
- NAKATA, K.; FUKUMOTO, O.; FUJIMOTO, K.; FUJIKAWA, Y. - Development of hypoxic change of the liver cells as revealed by the isolated perfused rat liver. Acta Pathol. Jap. 21: 313-328, 1971.
- NARDO, B.; GASBARRINI, A.; SIMONCINI, M.; CUCCOMARINO, S.; DE NOTARIIS, S.; RECORDARE, A.; TURI, P.; CARACENI, P.; TREVISANI, F.; MAZZIOTTI, A.; BERNARDI, M.; CAVALLARI, A. - Reduction of rat hepatic ischemia/reperfusion injury by intermittent anoxia. In: CAVALLARI, A.; MAZZIOTTI, A. & PRINCIPE, A. ed. - Liver. Bologna, Monduzzi Editore - International Proceedings Division, 1996. p.139-142. (2nd World Congress International Hepato Pancreato Biliary Association, Bologna, Italia, 1996)
- NATORI, S.; FUJII, Y.; KUROSAWA, H.; NAKANO, A.; SHIMADA, H. - Efficacy and mechanism of PGE 1 (prostaglandin E1) infused via portal vein on hepatic ischemia-reperfusion injury. In: CAVALLARI, A.; MAZZIOTTI, A. & PRINCIPE, A. ed. - Liver. Bologna, Monduzzi Editore - International Proceedings Division, 1996. p.167-171. (2nd World Congress International Hepato Pancreato Biliary Association, Bologna, Italia, 1996)
- NAUTA, R.J.; TSIMOYIANNIS, E.; URIBE, M.; WALSH, D.B.; MILLER, D.; BUTTERFIELD, A. - Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. Surg. Gynecol. Obstet., 171: 120-125, 1990.

- NEPOMUCENO, M.F.; MACEDO, D.V.; PEREIRA-DA-SILVA, L. - Lipoperoxidation associated with mitochondrial membrane permeabilization in the presence of Ca^{2+} . Brazilian J. Med. Biol. Res (24): 833-836, 1991.
- NISHIYAMA, R.; NAKAMURA, S.; SUZUKI, S.; BABA, S. - Platelet-activating factor in ischemia /reperfusion injury - The effects of a *PAF*-antagonist combined with a prostaglandin I_2 analogue. Transplantation: 55(6): 1261-1265, 1993.
- NOACK, K; BRONK, S.F.; KATO, A.; GORES, G.J. - The greater vulnerability of bile duct cells to reoxygenation injury than to anoxia: implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. Transplantation, 56: 495-500, 1993.
- NORDLINGER, B.; DOUVIN, D.; JAVAUDIM, L.; BLOCH, P.; ARANDA, A.; BOSCHAT, M. & HUGET, C. - An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. Surg. Gynecol. Obstet., 150: 859-864, 1980.
- NORDSTRÖM, G.; WINSÖ, O.; BIBER, B.; HASSELGREN, P.O.- Influence of pentobarbital and chlorase on metabolic and hemodynamic changes in liver ischemia. Ann. Surg.: 23-29, 1990.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, N. - Assay for lipid peroxidases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Bioch. 95: 351-358, 1979.
- OHKOHCHI, N.; KANNO, M.; TERASHIMA, T.; TAGUCHI, Y.; MORI, S.; SAEKI, R.; USA, T.; INABA, H.; MIYAZAWA, T. - Assessment of the viability of liver allografts by chemiluminescence. Transplant. Proc. 21(1): 1332-1334, 1989.
- OKANO, K.; KOKUDO, Y.; OKAJIMA, K.; HOSSAIN, M.A.; ISHIMURA, K.; YACHIDA, S.; TSUBOUCHI, T.; WAKABAYASHI, H.; MAEBA, T.; MAETA, H. - protective effects of antithrombin III supplementation on warm ischemia and reperfusion injury in rat liver. World J. Surg. 20: 1069-1075, 1996.
- ONTELL, S.; MAKOWKA, L.; TRAGER, J.; MAZZAFERRO, V.; OVE, P., STARZL, T.E. - Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. Ann. Surg. 209(2): 200-212, 1989.

- ORRENIUS, S.; THOR, H.; RAJS, J.; BERGGREN, M.- Isolated rat hepatocytes as an experimental tool in the study of cell injury. Effect of anoxia. Forensic. Science. 8: 255-263, 1976.
- OZAWA, K. - Liver surgery approached through the mitochondria - The redox theory in evolution. Medical Tribune, Tokyo, 1992. p.27-47.
- OZAWA, K.; SETA, K.; ARAKI, H.; HANDA, H.- The effect of ischemia on mitochondrial metabolism. J. Biochem. 61 (4): 512-514, 1966.
- PAPADOPOULOS, N.M. - Clinical applications of lactate dehydrogenase isoenzymes. Ann Clin. Lab. Sci. 7: 506-510, 1977.
- PARKS, D.A. & GRANGER, D.A. - Ischemia-reperfusion injury: a radical view. (editorial) Hepatology, 8: 680-682, 1988.
- PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. - Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. Surgery, 94: 428-432, 1983.
- PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N.; HAMILTON, S.R.; McCORD, J.M. - Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. Gastroenterology, 82: 9-15, 1982.
- PEDERSEN, P. L.; GRENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMANTE, E. - Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. Meth. Cell. Biol., 20: 411-481, 1978.
- PENG, X.; CURRIN, R.T.; THURMAN, R.G.; LEMASTERS, J.L. - Protection by pentoxifylline against normothermic liver ischemia/reperfusion in rats. Transplantation, 59: 1537-1541, 1995.
- PIGNOL, B.; HENANE, S.; PIROTZKY, E.; MENCIA-HUERTA, J.M.; BRAQUET, P. - Potentiation of immunosuppressive action of cyclosporine A by platelet-activating factor antagonists: an approach of the mechanism of action of these drugs in the prevention of graft rejection. Transplant. Proc., 20(2): 259-265, 1988.

- PIROTZKY, E.; COLLIEZ, P.; GUILMARD, C.; SCHAEVERBEKE, J; BRAQUET, P. - Cyclosporine-induced nephrotoxicity: Preventive effect of a *PAF*-acether antagonist, BN 52063. Transplant. Proc. XX (3)-Suppl. 3: 665-669, 1988.
- POGETTI, R.S. - Alterações da estrutura do hepatócito na isquemia com e sem hipovolemia - Estudo ultramicroscópico em ratos - São Paulo, 1987. Tese - Doutorado- Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo.
- POST, S.; RENTSCH, M.; GONZALEZ, A.P.; PALMA, P.; OTTO, G.; MENDER, M.D. - Importance of the first minutes of reperfusion in hepatic preservation injury. Transplant. Proc. 27 (1): 727-728, 1995.
- PRETTO, E., - Cardiac function after hepatic ischemia-anoxia and reperfusion injury: a new experimental model. Crit. Care Med. 19: 1188-1194, 1991.
- PRINGLE, J. H. - Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due trauma. Ann. Surg. 48: 541-549, 1908.
- RADZIUK, J.- Metabolic function of the liver. Carbohydrates. In: CRAMP, D.G.; CARSON, E.R., ed. Liver function. London, Chapman and Hall, 1990. p.106-151.
- RAFFUCCI, F.L. & WANGENSTEEN, O.H. -Tolerance of dogs to occlusion to entire afferent vascular inflow to the liver. Surg. Forum. 1:191-195, 1950.
- RAFFUCCI, F.L. - The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. Surgery, 33: 342-351, 1953.
- RAUEN, U.; HANSSEN, M.; LAUCHAR, W.; BECKER, H.D. GROOT, H. - Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of the rat liver in UW solution. Transplantation, 55(3): 469-473, 1993.
- REED, D.J. & SAVAGE, M.K. - Influence of metabolic inhibitors on mitochondrial permeability transition and glutathione status. Biochim. Biophys. Acta 1271: 43-50, 1995.
- REICHLING, J.J. & KAPLAN, M. M. - Clinical use of serum enzymes in liver disease. Dig. Dis. Sci. 33(12): 1601-1614, 1988.

- RICHTER, C.; GOGVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEIZER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFEE, M. - Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. Biochim. Biophys. Acta, 1271: 67-74, 1995.
- RIZZO, C.C.- Repercussões hemodinâmicas, cardíacas e pulmonares na isquemia e reperfusão parciais do fígado em ratos. Ribeirão Preto, 1996, Tese- Doutorado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- RODRIGUE, BOYER, O., FEILLET, F.; LEMONNIER, A. - Lactate dehydrogenase isoenzyme LD2/LD5 ratio as an indicator of early graft function and complications following pediatric orthotopic liver transplantation. Transplant. Proc. 27(2): 1871-1874, 1995
- ROSAM, A.C.; WALLACE, J.L.; WHITTLE, B.J.R. - Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. Nature, 319: 54-57, 1986.
- ROSSER, B.G. & GORES, G.J. - Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. Gastroenterology, 108: 252-275, 1995.
- SAKR, M.F.; HASSANEIN, T.I.; ZETTI, G.M.; VAN THIEL, D.H. - FK 506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia. Life Sci. 47(8): 687-691, 1990.
- SATOH, K.; NAKAI, T.; ICHIHARA, K. - Influence of 3-hydroxy methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor as mitochondrial respiration in rat liver during ischemia. Eur. J. Pharmacol., 270(4): 365-369, 1994.
- SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H. - Estimation of total protein-bound, non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. Anal Bioch. 25: 192-205, 1968.[FB1]
- SHERLOCK, S. & DOOLEY, J. - Assessment of liver function. In: SHERLOCK, S. & DOOLEY, J. - Diseases of the liver and biliary system. 9ª ed., London, Black Well Scientific Publications, 1993. p.17-32.

- SHIBAYAMA, Y.; ASAKA, S.; NISHIJIMA, A. - Mechanism of liver injury following ischemia. Exp. Mol. Pathol., 55(3): 251-260, 1991.
- SHIBUYA, H.; OHKOHCHI, N.; SEYA, K.; SATOMI, S.; MORI, S. - Modulation of mitochondrial ATP synthesis and lipid peroxidation by Kupffer cells in liver grafts. Transplant. Proc. 28(1): 321-323, 1996.
- SHINOHARA, H.; TANAKA, A.; FUJIMOTO, T. HATANO, E.; SATOH, S.; FUJIMOTO, K.; NODA, T.; IDE, C.- Disorganization of microtubular network in postischemic liver dysfunction: its functional and morphological changes. Biochim. Biophys. Acta 1317(1): 27-35, 1996.
- SHIRATORI, Y.; KIRIYAMA, H.; FUKUSHI, Y.; NAGURA, T.; TAKADA, H.; HALK, K.; KAMII, K. - Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. Dig. Dis. Sci., 39(6): 1265-1272, 1994.
- SIMONDS, J.P. - A study of the simultaneas changes in blood pressure in the carotid artery and jugular and portal veins, in anaphilatic and peptone shock in the dog. Am. J. Physiol., 65: 512-519, 1923.
- SMITH, C.V.; JONES, D.P.; GUENTHNER, T.M.; LASH, L.H.; LAUTERBURG, B.H. - Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. Toxicol. Appl. Pharmacol., 140: 1-12, 1996.
- SOUZA, A.P.; COELHO, A.R. de B.; CÂMARA NETO, R.D.; FERRAZ, E.M.; RODRIGUES, J.V.; LIMA FILHO, J.F.C.; TELLES, A.M. da S.; SÖHSTEN, W.J.F. VON - Complete acute occlusion of the portal vein in dogs. I. A sutudy based on hemodynamic and hematologic data aimed at is its application in liver transplantation. ABCD Arq. Bras. Cir. Dig. 6: 15-19, 1991.
- SPIEGEL, H.U.; OLDHAFFER, K.J.; LANG, H.; SCHÜTTER, W.; BREMER, C.; PICHLMAYR, R. - Beneficial effect of the platelet-activating factor antagonist WEB 2170 on reperfusion injury after orthotopic liver transplantation. Transplant. Proc. 27(5): 2284-2885, 1995.
- STAFFORINI, D.M.; McINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M. - Platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. Methods Enzymol. 187: 344-357, 1990.

- STANSBY, G.; FULLER, B.; JEREMYS, J.; CHEETHAM, K.; ROLLES, K. - Endothelin release- A facet of reperfusion injury in clinical liver transplantation. Transplantation 56(1): 239-240, 1993.
- STARZL, T.E. & DEMETRIS, A.J. - Hepatic Transplantation. Chicago, Year Book, 1990, p.43-70.
- STARZL, T.E.; MARCHIORO, T.L.; VON KAULLA, K.N.; HERMANN, G.; BRITTAIN, R.S., WADDELL, W.R. - Hemotransplantation of the liver in humans. Surg. Gynecol. Obstet. 117: 659-676, 1963.
- STEINER, P.E. & MARTINEZ, J.B. - Effects on the rat liver bile duct, portal vein and hepatic artery ligations. Am. J. Pathol., 39(3): 257-289, 1961.
- STEWART, D.J.; POHL, U.; BASSENGE, E. - Free radicals inhibit endothelium dependent dilation in the coronary resistance bed. Am. J. Physiol. 255: H765-H769, 1988.
- STRYER, L. - Fosforilação Oxidativa. In: Bioquímica, 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.p.329-352.
- SUZUKI, S. & TOLEDO-PEREYRA, L.H. - Interleucine-1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. J. Surg. Res. 57(2): 253-258, 1994.
- SUZUKI, S. & TOLEDO-PEREYRA, L.H.- Monoclonal antibody to intercelular adhesion molecule 1 as an effective protection for liver ischemia and reperfusion injury. Transplant. Proc. 25(6): 3325-3327, 1993.
- SUZUKI, S.; TOLEDO-PEREYRA, L.H.; RODRIGUEZ, F.J.; CEJALVO, D.- Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Transplantation, 55(6): 1265-1272, 1993.
- TAKADA, Y.; BOUDJEMA, K.; JAECK, D.; BEL-HAOUARI, M.; DOGHMI, M.; CHENARD, M.P.; WOLF, P.; CINQUALBRE, J. - Effects of platelet-activating factor antagonist on preservation/reperfusion injury of the graft in porcine orthotopic liver transplantation. Transplantation, 59: 10-16, 1995a.

- TAKADA, Y.; SHIMAHARA, Y.; YAMAGUCHI, T.; NISHIZAWA, F.; MORI, K.; YAMAOKA, Y.; OZAWA, K. - Protective effect of platelet-activating factor antagonist on hepatic energy metabolism following transient hepatic inflow occlusion in rabbits. Circ. Shock, 38: 130-137, 1992.
- TAKADA, Y.; BOUDJEMA, K.; JAECK, D.; CHENARD, M.P.; WOLF, P.; CINQUALBRE, J.; YAMAOKA, Y. - Platelet activating factor antagonist has a protective effect on preservation/reperfusion injury of the graft in pig liver transplantation. Transplant. Proc. 7 (1): 747-748, 1995b.
- TAYLOR, A.E.; MARTIN, D.; PARKER, J.C. - The effects of oxygen radicals on pulmonary edema formation. Surgery, 94: 433-438, 1983.
- TERASHIMA, T.; OHKOHCHI, N.; KANNO, M.; SEYA, K.; ORII, T.; SATOMI, S.; TAGUCHI, Y.; MORI, S. - Role of neutrophils in lipid peroxidation at reperfusion in liver transplantation. Transplant. Proc., 28(1): 324-326, 1996.
- THURMAN, R.G.; BUNZENDHAL, H. & LEMASTERS, J.J. - Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation. Semin. Liver Dis., 13: 93-100, 1993.
- TOLEDO-PEREYRA, L.H. - Liver transplantation reperfusion injury - factors in its development and avenues for treatment. Klin. Wochenschr. 69: 1099-1104, 1991.
- TOLEDO-PEREYRA, L.H. - Role of prostaglandins (PGI₂) in improving the survival of ischemically damaged liver allografts. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 30: 390-394, 1984.
- TUFFIN, D.P. & WADE, P.J. - Calcium channel blocking drugs: a structural lead for PAF antagonists? Prostaglandins, 30: 702, 1985.
- UYEMURA, S.A. & CURTI, C. - Respiration and mitochondrial ATPase in energized mitochondria during isoproterenol-induced cell injury of myocardium. Int. J. Biochem., 23(10): 1143-1149, 1991.
- VERCESI, A.E. - The role of Ca⁺⁺ in the process of mitochondrial damage associated with oxidative stress. Química Nova, 16: 381-384, 1993.

- WALLACE, J.L. & MACNAUGHTON, W.K. - Gastrointestinal damage induced by platelet-activating factor: role of leukotrienes. Eur. J. Pharmacol. 151: 43-50, 1988.
- WANG, K.S.; MORITO, M.; KANAI, T.; GOTOH, M.; UMESHITA, K.; UKEI, T.; SHISADA, T.; MORI, T. - Protective effect of platelet-activating factor antagonist on ischemia-induced liver injury in rats. Surgery, 113(1): 76-83, 1993.
- WANNER, G.A.; ERTEL, W.; MULLER, P.; HOFER, Y.; LEIDERER, R.; MENDER, M.D.; MESSMER, K. - Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. Shock, 5(1): 34-40, 1996.
- WARD, P. - Mechanisms of endothelial cell injury (review). J. Lab. Clin. Med. 118(5): 421-426, 1991.
- WEISS, S.J. - Oxygen, ischemia and inflammation. Acta Physiol Scand., Suppl. 548: 9-37, 1986.
- WELBOURN, C.R.B.; GOLDMAN, G.; PATERSON, I.S.; VALERI, C.R.; SHEPRO, D.; HETCHMAN, H.B. - Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. Br. J. Surg., 78: 651-655, 1991.
- WILLET, K.; VAZ DE MACEDO, D.; DETRY, O.; EVENS, A.; PEREIRA DA SILVA, SLUSE, F.E. - Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and in vitro. Transplant. Proc. 27 (5): 2827-2828, 1995.
- WOODS, H.F. & KREBS, H.A. - Lactate production in the perfused rat liver. Biochem. J., 125: 129-39, 1971.
- YIN, M.; KURVERS, H.A.J.M.; BUURMAN, W.A.; TANGELDER, G.J.; TIEBOSCH, A.T.M.; DAEMEN, J.H.C.; KOOTSTRA, G. - Platelet-activating factor antagonist TCV-309 protects rat kidneys against ischemia-reperfusion injury. Transplant. Proc., 27(5): 2844-2846, 1995.
- YOKOYAMA, I.; KOBAYASHI, T.; NEGITA, M.; HAYASHI, S.; YASUTOMI, M.; KATAYAMA, A.; UCHIDA, K.; TAKAGI, H. - Liberation of vasoactive substances and its prevention with thromboxane A2 synthase inhibitor in pig liver transplantation. Transplant. Int., 9(1): 76-81, 1996.

ZHOU, W.; McCOLLUM, M.O.; LEVINE, B.A.; OLSON, M.S. - Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. Hepatology, 16(5): 1236-1240, 1992.

ZIMMERMAN, G.A.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT S.M. - Production of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells: evidence for a requirement for specific agonists and modulation by prostacyclin. Circulation, 72: 718-727, 1985.

ZIMMERMAN, G.A.; WHATLEY, R.E.; MCINTYRE, T.M.; BENSON, D.M.; PRESCOTT S.M. - Endothelial cells for studies of platelet-activating factor and arachidonate metabolites. Methods Enzymol. 187: 520-535, 1990.

APÊNDICE

Tabela 1 - Valores de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e da fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅), em UI/L; do consumo de oxigênio nos estados III e IV da respiração mitocondrial (μM de $\text{O}_2/\text{min.mg}$ proteína. 10^{-3}); da razão de controle respiratório (RCR); do conteúdo hepático mitocondrial de malondialdeído (MDA) e glutatona (GSH) em nmol/mg proteína, dos animais do grupo A (soro fisiológico), submetidos a 60 minutos de isquemia hepática seletiva (A2) e seus subgrupos controle (A1), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	peso (g)	AST	ALT	DHL ₅	RCR	EIII	EIV	MAD	GSH
A1	C	1	330	70	39	601	4,6	44,85	9,78	0,88	382,3
A1	C	2	325	74	37	156	6,1	42,95	6,99	0,76	393,8
A1	C	3	320	154	46	1094	5,5	40,62	7,38	0,82	375,9
A1	C	4	295	71	47	299	2	23,79	11,89	0,95	382,7
A1	C	5	330	80	42	350	2,9	27,27	9,37	1,03	375,6
A1	C	6	330	92	41	154	3,7	15,36	4,19	0,87	387,1
A1	R0	1	300	111	49	572	5,3	46	8,76	0,88	382,3
A1	R0	2	330	64	38	14	2,3	28,62	12,52	0,76	393,8
A1	R0	3	290	127	59	408	3,8	32,9	8,66	0,82	375,9
A1	R0	4	300	81	47	56	2,5	23,7	9,48	0,95	382,7
A1	R0	5	290	104	51	486	3,2	32,9	10,39	1,03	375,6
A1	R0	6	280	86	43	412	3,1	38,36	12,33	0,87	387,1
A1	R15	1	320	68	41	58	2,7	25,77	9,66	1,31	332,5
A1	R15	2	312	70	33	59	2,6	25,98	9,9	1,52	275,9
A1	R15	3	285	282	37	118	2,3	48,1	21,04	1,12	283,9
A1	R15	4	315	102	42	402	2,2	39	17,55	1,43	303,5
A1	R15	5	280	113	30	159	2,7	46,75	17,32	1,59	343,9
A1	R15	6	292	81	24	383	2,8	27,46	9,74	1,12	328,1
A1	R60	1	330	100	34	129	0,8	24,9	15,71	1,52	329,5
A1	R60	2	295	106	38	325	3,5	42,09	12,02	1,78	275,84
A1	R60	3	315	98	40	123	2,1	58,75	27,83	1,02	290,1
A1	R60	4	330	93	59	122	3,7	52,2	14	1,12	328,1
A1	R60	5	315	113	56	140	2,8	43,28	15,58	1,12	283,9
A1	R60	6	295	90	34	106	2,4	39,66	16,52	1,31	332,5
A2	C	1	280	74	42	203	1,5	26,18	13,96	0,95	430,2
A2	C	2	283	81	37	194	1,4	13,96	9,6	1,18	450,7
A2	C	3	270	63	30	111	2,3	19,18	8,39	1,25	430,3
A2	C	4	300	145	117	343	2,2	26,15	12,07	1,32	385,7
A2	C	5	287	42	39	140	1,6	25,11	15,98	1,29	372,3
A2	C	6	281	58	39	168	1,3	35,03	27,24	1,33	465,8
A2	R0	1	270	120	76	270	1,2	18,51	15,42	0,79	452,7
A2	R0	2	330	56	36	93	1,7	7,52	4,51	0,85	475,9
A2	R0	3	320	140	56	180	2,2	21,32	9,84	1,12	401,3
A2	R0	4	280	105	44	220	1,8	10,31	5,89	1,01	398,7
A2	R0	5	290	108	56	400	1,3	12,73	9,55	0,93	423,9
A2	R0	6	285	119	66	130	1,5	18,91	12,61	1,32	407,3
A2	R15	1	330	512	727	7598	2,5	24,88	9,95	1,22	330,2
A2	R15	2	275	297	407	3231	0,1	16,53	5,26	1,19	352,7
A2	R15	3	325	520	192	562	1,8	15,96	9,02	1,01	339,7
A2	R15	4	276	462	284	2167	2	22,31	11,16	1,09	352,9
A2	R15	5	298	1352	718	9286	1,7	7,16	4,09	0,89	347,1
A2	R15	6	293	394	133	2028	1,7	7,07	4,24	1,04	329,1
A2	R60	1	295	407	507	3342	2,9	32,8	11,48	0,98	352,7
A2	R60	2	330	506	611	3300	1,7	10	5,83	1,32	302,9
A2	R60	3	330	530	768	4082	2,3	17,62	7,55	1,19	385,9
A2	R60	4	290	529	679	4150	1,3	15,48	12,04	1,25	367,3
A2	R60	5	300	765	870	4385	2,8	21,2	7,63	1,32	358,9
A2	R60	6	270	720	479	5954	2,3	8,22	5,48	1,33	368,9

Tabela 2 - Valores de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e da fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅), em UI/L; do consumo de oxigênio nos estados III e IV da respiração mitocondrial (μM de $\text{O}_2/\text{min.mg}$ proteína 10^{-3}); da razão de controle respiratório (RCR); do conteúdo hepático mitocondrial de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) em nmol/mg proteína, dos animais do grupo A (soro fisiológico), submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva (A4) e seu controle (A3), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	peso (g)	AST	ALT	DHL ₅	RCR	EIII	EIV	MAD	GSH
A3	C	1	300	111	49	572	5,3	46	8,76	0,96	400,3
A3	C	2	330	64	38	14	2,3	28,62	12,52	0,78	375,3
A3	C	3	290	127	59	408	3,8	32,9	8,66	1,07	428,9
A3	C	4	290	81	47	56	2,5	23,71	9,48	0,69	415,6
A3	C	5	290	104	51	486	3,2	32,9	10,39	1,3	323,9
A3	C	6	280	86	43	412	3,1	38,36	12,33	0,78	395,8
A3	R0	1	312	54	94	50	4,7	21,49	4,61	0,96	400,3
A3	R0	2	330	72	37	74	3,5	16,38	4,68	0,78	375,3
A3	R0	3	330	57	38	47	2,7	14,97	5,45	1,07	428,9
A3	R0	4	325	87	37	119	3	20,04	6,68	0,69	415,6
A3	R0	5	330	72	40	125	4	16,73	4,18	1,3	323,9
A3	R0	6	330	70	20	34	4	23,92	5,98	0,78	395,8
A3	R15	1	295	79	31	80	2,3	28,06	12,02	1,37	315,8
A3	R15	2	290	110	35	86	3,5	31,13	8,9	1,42	280,3
A3	R15	3	325	77	31	16	3,3	49,19	14,76	1,07	355,9
A3	R15	4	295	79	33	7	2,8	42,14	15,32	1,52	322,9
A3	R15	5	330	119	48	118	4	35,78	8,94	1,32	301,9
A3	R15	6	315	77	28	64	2,8	31,33	11,39	1,45	297,5
A3	R60	1	310	127	65	436	2,4	23,19	9,66	1,42	387,3
A3	R60	2	311	87	41	580	2,9	33,2	11,29	1,72	375,9
A3	R60	3	330	93	59	170	1,6	19,77	12,49	1,35	382,9
A3	R60	4	330	92	34	266	2,5	34,99	14,26	1,22	362,6
A3	R60	5	270	120	44	72	4,2	32,73	7,61	1,35	352,6
A3	R60	6	330	117	58	205	2,3	39,53	16,94	1,5	363,9
A4	C	1	300	111	49	572	5,3	46	8,76	0,78	412,8
A4	C	2	330	64	38	14	2,3	28,62	12,52	1,12	362,9
A4	C	3	290	127	59	408	3,8	32,9	8,66	0,95	431,5
A4	C	4	300	81	47	56	2,5	23,7	9,48	1,35	385,9
A4	C	5	290	104	51	486	3,2	23,7	9,48	0,87	387,1
A4	C	6	290	86	43	412	3,1	38,36	12,33	0,9	312,1
A4	R0	1	330	81	41	120	1,3	17,42	13,68	0,78	412,8
A4	R0	2	330	74	33	104	1,5	14,31	10,73	1,12	362,9
A4	R0	3	330	82	42	192	1,3	14,31	10,73	0,95	431,5
A4	R0	4	330	107	66	57	1,4	16,1	11,57	1,35	385,9
A4	R0	5	330	70	38	79	2,5	17,22	6,76	0,87	387,1
A4	R0	6	330	116	49	129	2,6	14,26	5,55	0,9	312,1
A4	R15	1	280	250	57	1931	1,7	14,31	8,18	1,35	289
A4	R15	2	315	221	332	1365	1,7	14,3	8,58	1,35	257,1
A4	R15	3	325	227	320	1262	1,3	13,63	10,22	1,52	242,1
A4	R15	4	300	413	413	1819	1,3	19,46	14,59	1,72	279,3
A4	R15	5	300	413	599	2150	1,5	15,1	10,07	1,35	304,1
A4	R15	6	325	315	125	1936	1,8	12,73	7,27	1,22	337,1
A4	R60	1	285	2008	2229	5992	1,4	21,43	15	1,53	252,7
A4	R60	2	305	530	762	3241	1,4	13,53	9,37	1,01	375,9
A4	R60	3	330	460	710	790	1,5	14,69	10,05	1,45	392,3
A4	R60	4	330	51	809	784	1,3	13,14	10,05	0,95	232,7
A4	R60	5	330	394	175	2100	1,3	12,22	9,6	1,75	253,9
A4	R60	6	330	450	372	3588	1,4	20,78	14,72	1,49	295,8

Tabela 3 - Valores de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e da fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅), em UI/L; do consumo de oxigênio nos estados III e IV da respiração mitocondrial (μM de $\text{O}_2/\text{min.mg}$ proteína. 10^{-3}); da razão de controle respiratório (RCR); do conteúdo hepático de malondialdeído (MDA) e glutatona (GSH) em nmol/mg proteína, dos animais do grupo B (WEB 2086), submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva (B2) e seus controle (B1), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperfusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	peso (g)	AST	ALT	DHL ₅	RCR	EIII	EIV	MAD	GSH
B1	C	1	270	74	42	203	1,5	26,18	17,45	0,95	430,2
B1	C	2	283	81	37	194	1,4	13,96	9,6	1,18	385,7
B1	C	3	270	63	30	111	2,4	19,18	8,39	1,25	458,7
B1	C	4	300	145	117	343	2,2	26,15	12,07	1,32	430,3
B1	C	5	287	42	39	140	1,6	25,11	15,98	1,29	372,3
B1	C	6	281	58	39	168	1,3	35,03	27,24	1,33	465,8
B1	R0	1	308	96	73	84	2,6	46,53	12,14	0,95	430,2
B1	R0	2	280	75	31	164	1,8	48,94	26,35	1,18	385,7
B1	R0	3	305	69	30	36	2,3	17,83	7,64	1,25	450,7
B1	R0	4	307	63	15	37	2,2	14,51	6,69	1,32	430,3
B1	R0	5	310	53	25	51	1,4	20,66	15,22	1,29	372,3
B1	R0	6	295	55	32	20	2,4	18,48	14,31	1,33	465,8
B1	R15	1	330	106	50	94	1,7	57,25	32,71	1,17	305,3
B1	R15	2	330	182	62	107	3,2	64,56	19,98	0,95	353,6
B1	R15	3	320	84	36	118	3,5	93,93	26,54	1,42	302,3
B1	R15	4	290	80	30	56	1,8	95,06	29,25	1,23	378,3
B1	R15	5	289	60	30	50	3,5	20,04	7,91	1,32	345,7
B1	R15	6	287	75	33	139	3,7	48,55	13,15	0,95	306,3
B1	R60	1	285	125	91	230	1,5	26,67	17,78	1,4	375,8
B1	R60	2	280	91	28	34	2,1	45,19	21,41	0,89	395,8
B1	R60	3	278	101	33	56	2,1	53,2	25,68	1,03	430,2
B1	R60	4	330	906	125	215	1,6	30,16	18,63	0,92	315,2
B1	R60	5	330	137	31	143	1,6	19,1	11,67	1,22	472,3
B1	R60	6	320	86	32	41	2,7	16,66	6,25	1,18	395,8
B2	C	1	293	73	122	148	1,5	31,56	20,29	0,95	430,2
B2	C	2	312	72	70	261	1,6	32,06	20,04	1,18	385
B2	C	3	300	71	31	74	2	8,66	4,33	1,25	450,7
B2	C	4	310	64	22	138	2,6	21,28	8,33	1,32	430
B2	C	5	305	73	30	122	1,2	10,76	8,96	1,29	372,3
B2	C	6	280	106	53	34	1,2	15,73	13,11	1,33	465,8
B2	R0	1	293	73	122	148	1,5	31,56	20,29	0,95	430,2
B2	R0	2	312	72	70	261	1,6	32,06	20,04	1,18	385
B2	R0	3	300	71	31	74	2	8,66	4,33	1,25	450,7
B2	R0	4	310	64	22	138	2,6	21,28	8,33	1,32	430,1
B2	R0	5	305	73	30	122	1,2	10,76	8,96	1,29	372
B2	R0	6	280	106	53	34	1,2	15,73	13,11	1,33	465
B2	R15	1	292	619	623	6539	3,2	81,01	25,07	1,21	325,8
B2	R15	2	327	541	931	4796	1,5	51,11	33,33	1,32	342,8
B2	R15	3	295	230	1048	4828	1,8	48,1	25,1	1,01	352,3
B2	R15	4	295	620	937	3756	1,9	54,11	28,86	1,25	400,1
B2	R15	5	285	500	312	7243	4,3	22,95	5,35	0,89	372,3
B2	R15	6	295	470	434	4616	1,6	14,65	9,16	1,4	295,7
B2	R60	1	282	648	1676	8924	1,7	40,08	24,05	1,18	362,5
B2	R60	2	330	1352	908	6319	1,1	31,63	28,3	0,96	375,9
B2	R60	3	315	6082	1873	8516	1,2	32,3	25,84	1,35	382,7
B2	R60	4	320	619	762	2786	1,9	26,61	14,33	1,42	425,9
B2	R60	5	280	980	1422	9380	1,8	36,21	20,12	1,05	413,9
B2	R60	6	271	1194	2420	9400	2	44,79	22,4	1,07	395,8

Tabela 4 - Valores de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e da fração 5 da desidrogenase láctica (DHL₅), em UI/L; do consumo de oxigênio nos estados III e IV da respiração mitocondrial (μM de $\text{O}_2/\text{min.mg}$ proteína 10^{-3}); da razão de controle respiratório (RCR); do conteúdo hepático de malondialdeído (MDA) e glutatona (GSH) em nmol/mg proteína, dos animais do grupo B (WEB 2086), submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva (B4) e seus controle (B3), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	peso (g)	AST	ALT	DHL5	RCR	EIII	EIV	MAD	GSH
B3	C	1	328	60	29	71	2,9	20,81	7,28	0,83	379,3
B3	C	2	327	61	32	118	2,7	15,32	5,75	0,82	387,9
B3	C	3	329	89	24	227	3,4	28,82	8,48	0,43	430,1
B3	C	4	282	70	37	161	2,4	34,85	14,67	1,03	353,8
B3	C	5	292	46	22	95	2,4	33,16	13,96	1,12	393,1
B3	C	6	320	58	22	30	1,8	24,98	13,87	0,92	405,54
B3	R0	1	328	60	29	71	2,9	20,81	7,28	0,83	379,3
B3	R0	2	327	61	32	118	2,7	15,32	5,75	0,82	387,9
B3	R0	3	329	89	24	227	3,4	28,82	8,48	0,43	430,1
B3	R0	4	282	70	37	161	2,4	34,85	14,67	1,03	353,8
B3	R0	5	292	46	22	95	2,4	33,16	13,96	1,12	393,1
B3	R0	6	320	58	22	30	1,8	24,98	13,87	0,92	405,5
B3	R15	1	320	76	34	200	3,7	29,04	7,92	1,03	398,2
B3	R15	2	277	108	43	166	2,1	47,25	22,86	0,96	378,3
B3	R15	3	320	198	34	96	3,1	50,51	16,23	1,22	302,7
B3	R15	4	305	127	94	61	2,4	48,98	20,54	0,76	340,5
B3	R15	5	325	83	25	306	5,8	44,52	7,67	1,44	360,7
B3	R15	6	310	66	20	277	4,7	26,35	5,65	0,99	320,3
B3	R60	1	330	112	80	405	1,7	39,71	22,84	1,4	375,8
B3	R60	2	330	108	29	89	1,4	45,09	31,56	0,89	395,8
B3	R60	3	287	72	17	163	2,1	21,9	10,31	1,03	430,2
B3	R60	4	270	73	34	320	1,7	24,73	14,84	0,92	315,2
B3	R60	5	313	60	18	96	1,3	21,2	16,96	1,32	472,3
B3	R60	6	326	72	44	238	1,4	30,26	20,95	1,16	395,8
B4	C	1	302	63	28	118	2,5	10,41	4,16	0,83	379,3
B4	C	2	300	109	39	129	2,5	11,16	4,46	0,82	387,9
B4	C	3	293	113	40	454	1,4	18,07	12,91	0,83	430,1
B4	C	4	303	87	31	154	1,7	16,95	8,31	1,03	353,8
B4	C	5	295	72	27	393	2	17,67	8,8	1,12	393,1
B4	C	6	298	71	27	597	2	17,46	8,73	0,92	405,5
B4	R0	1	302	63	28	118	2,5	10,41	4,16	0,83	379,3
B4	R0	2	300	109	39	129	2,5	11,16	4,46	0,82	387,9
B4	R0	3	293	113	40	420	1,4	18,07	12,91	0,43	430,1
B4	R0	4	303	87	31	154	1,7	16,95	8,31	1,03	353,3
B4	R0	5	295	72	27	393	2	17,67	8,8	1,12	393,1
B4	R0	6	298	71	27	597	2	17,46	8,73	0,92	405,5
B4	R15	1	293	390	367	2710	1,6	29,86	18,66	0,98	403,7
B4	R15	2	320	597	972	4080	1,4	34,32	23,76	1,42	395,3
B4	R15	3	290	665	1213	5553	1,1	14,67	12,84	1,16	421,8
B4	R15	4	315	484	1276	5480	1,3	14,43	10,82	1,22	381,2
B4	R15	5	310	4280	4352	3200	4,5	34,65	7,7	1,08	395,8
B4	R15	6	287	4280	4444	3286	2,4	28,68	11,87	1,35	450,7
B4	R60	1	318	1825	1543	10990	1,7	30,52	18,04	1,32	321
B4	R60	2	320	4167	2946	16050	1,1	25,46	23,34	0,95	295,3
B4	R60	3	290	1644	1937	9594	1,3	29,31	21,98	0,75	235,7
B4	R60	4	300	1656	2915	10810	1,3	26,06	20,26	1,25	352,9
B4	R60	5	290	343	606	3165	1,3	18,62	13,96	1,03	335,6
B4	R60	6	305	861	1854	8980	1,4	11,2	7,84	0,83	345,9

Tabela 5 - Valores da pressão arterial média (PAM), em mmHg, e da pressão venosa central (PVC), em cm H₂O, dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia hepática seletiva e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos, nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

subgrupo/anim.º	peso (g)	PAM (C)	PAM(R0)	PAM (R15)	PAM (R60)	PVC (C)	PVC (R0)	PVC (R15)	PVC (R60)
A1/1	310	108	124	108	92	2,4	4	5,6	1,6
A1/2	330	112	108	100	100	-3,2	0	0	0
A1/3	315	112	132	132	120	2,4	10,4	6,4	5,6
A1/4	320	82	120	112	112	-0,8	0,8	-1,6	0
A1/5	300	108	132	116	126	-2,4	-0,8	-0,8	0
A1/6	315	104	96	88	60	1,6	0	-1,6	-0,8
A2/1	330	80	76	64	104	0	4,8	5,6	6,4
A2/2	330	124	128	116	116	-2,4	-3,2	-2,4	-2,4
A2/3	310	114	104	52	72	-3,2	-4	-4	-2,4
A2/4	295	138	112	88	32	0	0	-1,6	1,6
A2/5	330	120	92	60	88	-0,8	-0,8	0,8	-1,6
A2/6	330	88	104	68	40	-0,8	2,4	1,6	1,6
A3/1	290	124	100	76	72	0	2,4	0,8	1,6
A3/2	310	112	104	100	92	-2,4	-1,6	-2,4	-1,6
A3/3	315	120	108	100	72	-0,8	-1,6	-2,4	-2,4
A3/4	320	116	116	108	120	0	-0,8	-1,6	-1,6
A3/5	300	124	124	128	100	-0,8	1,6	0,8	0
A3/6	315	140	148	148	146	-2,4	-2,4	-7,2	-0,8
A4/1	330	108	86	38	12	-4	-5,6	-6,4	4
A4/2	325	124	100	52	100	-0,8	-1,6	-5,6	0
A4/3	325	100	100	66	92	-4,8	-4,8	-4	-9,9
A4/4	315	96	96	72	108	-1	-8	-2,4	-5,6
A4/5	325	136	98	82	88	-0,8	-1,6	0,8	0,8
A4/6	310	108	88	78	104	0	-0,8	0,8	2,4
B1/1	310	128	110	96	92	-0,8	0	-2,4	-3,8
B1/2	325	100	108	84	100	-0,8	-0,8	2,4	1,6
B1/3	295	144	124	116	84	-1,6	-3,2	-3,2	0,8
B1/4	290	88	116	104	108	4,8	2,4	5,6	0,8
B1/5	300	40	96	88	48	1,6	1,6	3,6	-1,6
B1/6	310	124	92	100	60	4	5,6	0,8	1,6
B2/1	325	116	128	112	108	-4	-4	-4	-2,4
B2/2	315	96	40	56	56	-1,6	-3,2	-3	-3
B2/3	300	128	132	72	98	-2,4	-1,6	-3	-2,4
B2/4	315	112	80	116	64	0,8	0,8	0,4	0,8
B2/5	330	116	128	102	120	0,8	-2,4	-3,6	-4
B2/6	325	124	132	136	98	1	0,8	0,8	1,6
B3/1	330	108	88	88	92	0	-0,8	-1,6	-0,8
B3/2	325	136	104	96	96	0,8	1,6	-0,8	-0,8
B3/3	330	108	108	112	116	0	-3,2	0	0,8
B3/4	325	124	78	96	84	-3,2	1,6	-4	-1,6
B3/5	330	136	100	60	76	0,8	-0,8	-3,2	-1,6
B3/6	330	120	96	96	96	-2,4	-3,2	-1,6	-3,2
B4/1	325	146	118	84	100	2,4	1,6	2,4	4,8
B4/2	310	148	132	124	124	-1,6	4	4	1,6
B4/3	330	136	124	108	112	-3,2	5,6	-1,6	-0,8
B4/4	315	140	112	116	64	1,6	4	2,4	1,6
B4/5	330	112	80	96	44	0	-0,8	-1,6	1,6
B4/6	325	126	108	92	92	2,4	9,9	0,8	0

Tabela 6 - Grau de acometimento observado na análise histológica das biópsias dos animais do grupo A (soro fisiológico), submetidos a 60 minutos de isquemia hepática seletiva (A2) e seu controle (A1), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	Congestão	Vacuolização	Necrose	Neutrófilos
A1	C	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A1	C	2	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A1	C	3	Ausente	Moderada	Ausente	Ausente
A1	C	4	Leve	Leve	Leve	Leve
A1	C	5	Ausente	Leve	Moderada	Moderada
A1	C	6	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A1	R0	1	Ausente	Leve	Ausente	Ausente
A1	R0	2	Leve	Ausente	Leve	Leve
A1	R0	3	Leve	Ausente	Leve	Leve
A1	R0	4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A1	R0	5	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A1	R0	6	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A1	R15	1	Ausente	Leve	Leve	Leve
A1	R15	2	Ausente	Leve	Leve	Leve
A1	R15	3	Ausente	Moderada	Leve	Leve
A1	R15	4	Ausente	Ausente	Leve	Ausente
A1	R15	5	Leve	Ausente	Moderada	Ausente
A1	R15	6	Leve	Ausente	Leve	Leve
A1	R60	1	Leve	Ausente	Leve	Leve
A1	R60	2	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A1	R60	3	Ausente	Leve	Moderada	Moderada
A1	R60	4	Ausente	Leve	Leve	Leve
A1	R60	5	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A1	R60	6	Leve	Leve	Leve	v
A2	C	1	Leve	Ausente	Leve	Leve
A2	C	2	Leve	Ausente	Leve	Leve
A2	C	3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A2	C	4	Leve	Ausente	Leve	Ausente
A2	C	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A2	C	6	Leve	Ausente	Ausente	Ausente
A2	R0	1	Moderada	Leve	Leve	Leve
A2	R0	2	Moderada	Leve	Leve	Leve
A2	R0	3	Ausente	Ausente	Moderada	Moderada
A2	R0	4	Leve	Ausente	Leve	Leve
A2	R0	5	Moderada	Leve	Leve	Leve
A2	R0	6	Moderada	Leve	Leve	Leve
A2	R15	1	Moderada	Leve	Moderada	Moderada
A2	R15	2	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
A2	R15	3	Severa	Leve	Leve	Leve
A2	R15	4	Severa	Severa	Leve	Leve
A2	R15	5	Severa	Severa	Leve	Leve
A2	R15	6	Moderada	Leve	Leve	Leve
A2	R60	1	Severa	Moderada	Leve	Leve
A2	R60	2	Moderada	Ausente	Leve	Leve
A2	R60	3	Severa	Leve	Leve	Leve
A2	R60	4	Severa	Moderada	Leve	Leve
A2	R60	5	Moderada	Leve	Leve	Leve
A2	R60	6	Leve	Leve	Leve	Leve

Tabela 7 - Grau de acometimento observado na análise histológica das biópsias dos animais do grupo A (soro fisiológico), submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva (A4) e seu controle (A3), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperfusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	Congestão	Vacuolização	Necrose	Neutrófilos
A3	C	1	Ausente	Leve	Ausente	Ausente
A3	C	2	Leve	Ausente	Leve	Leve
A3	C	3	Leve	Ausente	Leve	Leve
A3	C	4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A3	C	5	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A3	C	6	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A3	R0	1	Ausente	Leve	Leve	Leve
A3	R0	2	Ausente	Leve	Leve	Leve
A3	R0	3	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R0	4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A3	R0	5	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R0	6	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R15	1	Leve	Moderada	Leve	Leve
A3	R15	2	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A3	R15	3	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R15	4	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R15	5	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A3	R15	6	Leve	Ausente	Leve	Leve
A3	R60	1	Ausente	Moderada	Leve	Leve
A3	R60	2	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R60	3	Ausente	Leve	Moderada	Moderada
A3	R60	4	Leve	Moderada	Ausente	2
A3	R60	5	Leve	Leve	Leve	Leve
A3	R60	6	Leve	Leve	Leve	Leve
A4	C	1	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
A4	C	2	Ausente	Leve	Leve	Leve
A4	C	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
A4	C	4	Moderada	Ausente	Leve	Leve
A4	C	5	Leve	Moderada	Leve	Leve
A4	C	6	Leve	Ausente	Leve	Leve
A4	R0	1	Ausente	Leve	Ausente	Ausente
A4	R0	2	Leve	Ausente	Leve	Leve
A4	R0	3	Leve	Ausente	Leve	Leve
A4	R0	4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
A4	R0	5	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A4	R0	6	Ausente	Ausente	Leve	Leve
A4	R15	1	Severa	Moderada	Leve	Leve
A4	R15	2	Severa	Leve	Leve	Leve
A4	R15	3	Severa	Leve	Leve	Leve
A4	R15	4	Severa	Leve	Leve	Leve
A4	R15	5	Severa	Leve	Leve	Leve
A4	R15	6	Severa	Leve	Leve	Leve
A4	R60	1	Severa	Leve	Leve	Leve
A4	R60	2	Moderada	Leve	Ausente	Ausente
A4	R60	3	Leve	Leve	Moderada	Leve
A4	R60	4	Leve	Leve	Leve	Leve
A4	R60	5	Leve	Leve	Ausente	Ausente
A4	R60	6	Ausente	Leve	Moderada	Moderada

Tabela 8 - Grau de acometimento observado na análise histológica das biópsias dos animais do grupo B (WEB 2086), submetidos a 60 minutos de isquemia hepática seletiva (B2) e seu controle (B1), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperfusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	Congestão	Vacuolização	Necrose	Neutrófilos
B1	C	1	Leve	Ausente	Leve	Leve
B1	C	2	Leve	Ausente	Leve	Leve
B1	C	3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
B1	C	4	Leve	Ausente	Leve	Ausente
B1	C	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
B1	C	6	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
B1	R0	1	Leve	Leve	Leve	Leve
B1	R0	2	Ausente	Leve	Leve	Leve
B1	R0	3	Ausente	Ausente	Leve	Leve
B1	R0	4	Ausente	Ausente	Leve	Leve
B1	R0	5	Leve	Moderada	Leve	Leve
B1	R0	6	Leve	Leve	Leve	Leve
B1	R15	1	Ausente	Leve	Leve	Leve
B1	R15	2	Leve	Ausente	Leve	Leve
B1	R15	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B1	R15	4	Ausente	Ausente	Leve	Leve
B1	R15	5	Leve	Ausente	Leve	Ausente
B1	R15	6	Ausente	Leve	Leve	Leve
B1	R60	1	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
B1	R60	2	Leve	Leve	Leve	Leve
B1	R60	3	Leve	Moderada	Leve	Leve
B1	R60	4	Ausente	Leve	Leve	Leve
B1	R60	5	Leve	Leve	Leve	Leve
B1	R60	6	Ausente	Ausente	Leve	Leve
B2	C	1	Moderada	Leve	Leve	Leve
B2	C	2	Leve	Leve	Leve	Leve
B2	C	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B2	C	4	Leve	Leve	Leve	Leve
B2	C	5	Leve	Ausente	Leve	Leve
B2	C	6	Leve	Ausente	Leve	Leve
B2	R0	1	Moderada	Leve	Leve	Leve
B2	R0	2	Leve	Leve	Leve	Leve
B2	R0	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B2	R0	4	Leve	Leve	Leve	Leve
B2	R0	5	Leve	Ausente	Leve	Leve
B2	R0	6	Leve	Ausente	Leve	Leve
B2	R15	1	Severa	Severa	Leve	Leve
B2	R15	2	Moderada	Moderada	Leve	Leve
B2	R15	3	Severa	Moderada	Moderada	Leve
B2	R15	4	Severa	Moderada	Leve	Leve
B2	R15	5	Severa	Moderada	Leve	Leve
B2	R15	6	Severa	Leve	Leve	Leve
B2	R60	1	Moderada	Moderada	Leve	Leve
B2	R60	2	Leve	Leve	Leve	Leve
B2	R60	3	Leve	Leve	Leve	Leve
B2	R60	4	Leve	Moderada	Leve	Leve
B2	R60	5	Moderada	Moderada	Leve	Leve
B2	R60	6	Leve	Leve	Leve	Leve

Tabela 9 - Grau de acometimento observado na análise histológica das biópsias dos animais do grupo B (WEB 2086), submetidos a 90 minutos de isquemia hepática seletiva (B4) e seu controle (B3), nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

subgrupo	tempo	animal	Congestão	Vacuolização	Necrose	Neutrófilos
B3	C	1	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	C	2	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	C	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	C	4	Ausente	Leve	Ausente	Ausente
B3	C	5	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	C	6	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	R0	1	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	R0	2	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	R0	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	R0	4	Ausente	Leve	Ausente	Ausente
B3	R0	5	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	R0	6	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	R15	1	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	R15	2	Ausente	Ausente	Leve	Leve
B3	R15	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	R15	4	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	R15	5	Leve	Leve	Moderada	Moderada
B3	R15	6	Leve	Moderada	Leve	Leve
B3	R60	1	Ausente	Leve	Leve	Leve
B3	R60	2	Leve	Leve	Ausente	Ausente
B3	R60	3	Leve	Moderada	Moderada	Moderada
B3	R60	4	Moderada	Leve	Leve	Leve
B3	R60	5	Leve	Leve	Leve	Leve
B3	R60	6	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	C	1	Moderada	Leve	Leve	Ausente
B4	C	2	Leve	Leve	Leve	Leve
B4	C	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	C	4	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	C	5	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	C	6	Moderada	Leve	Leve	Leve
B4	R0	1	Moderada	Leve	Leve	Ausente
B4	R0	2	Leve	Leve	Leve	Leve
B4	R0	3	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	R0	4	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	R0	5	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	R0	6	Moderada	Leve	Leve	Leve
B4	R15	1	Severa	Leve	Leve	Leve
B4	R15	2	Severa	Leve	Leve	Leve
B4	R15	3	Severa	Leve	Leve	Leve
B4	R15	4	Severa	Leve	Leve	Leve
B4	R15	5	Leve	Severa	Leve	Leve
B4	R15	6	Ausente	Leve	Leve	Leve
B4	R60	1	Severa	Leve	Leve	Leve
B4	R60	2	Severa	Moderada	Leve	Leve
B4	R60	3	Leve	Leve	Leve	Leve
B4	R60	4	Severa	Leve	Leve	Leve
B4	R60	5	Ausente	Leve	Leve	Ausente
B4	R60	6	Moderada	Leve	Leve	Leve

Tabela 10 - Média e desvio-padrão da variável transformada aspartato aminotransferase AST (UI/L) dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (WEB 2086), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	84,3±27,2	92,0±23,9	98,8±42,7	99,3±7,6
A2	63,0±42,9	101,5±31,9	204,6±20,4	209,8±9,9
A3	92,0±23,9	60,0±19,2	87,0±18,8	103,6±14,7
A4	92,1±23,9	85,5±19,6	177,9±15,9	180,2±77,7
B1	63,0±42,9	58,5±23,6	88,7±34,6	105,2±52,9
B2	71,5±17,2	71,4±17,1	201,3±19,0	235,1±20,9
B3	50,9±24,6	50,8±24,8	98,9±35,2	78,7±25,0
B4	81,6±23,9	81,6±24	226,5±31,8	236,7±27,4

Tabela 11 - Média e desvio-padrão da variável transformada alanina aminotransferase ALT (UI/L) dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (WEB 2086), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	41,7±4,0	47,0±6,3	32,2±9,7	42,1±10,4
A2	44,0±19	52,2±11,1	112,5±18,8	129,2±5,3
A3	47,0±6,3	38,5±21,2	32,2±8,3	48,1±10,6
A4	47,1±6,3	43,4±10	101,7±27,3	127,5±20,2
B1	44,1±19	26,5±23,3	37,9±12,9	44,9±26,1
B2	44,1±26,4	44,0±26,4	129,3±11,5	145,6±8,6
B3	21,8±10,2	21,9±10,2	34,5±22,9	28,3±26,2
B4	29,0±8,2	29,0±8,3	145,4±18,6	149,6±11,4

Tabela 12 - Média e desvio-padrão da variável transformada fração 5 da desidrogenase láctica DHL₅ (U/L) dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	316,7±164,3	203,2±276,7	146,7±164,5	139,4±79,7
A2	181,9±75,7	195,6±102,3	833,7±272,7	920,3±61,7
A3	203,2±276,7	-0,6±91,9	-69,2±176,3	237,6±146,9
A4	203,2±276,7	80,3±76,5	683,9±54,3	747,6±217,5
B1	181,9±75,7	-42,4±125,9	47±73,5	57,3±153,5
B2	88±125,4	88±125	985,7±70,9	1078,5±138,5
B3	69±125,3	69±125	159,6±118,5	190,7±122,4
B4	250,5±145,5	247,7±142,8	905,8±84,2	1155,6±165,0

Tabela 13 - Média e desvio-padrão da variável transformada consumo de oxigênio pelas mitocôndrias ($\mu\text{M de O}_2/\text{min.mg proteína.10}^{-3}$) no estado III da respiração mitocondrial dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	29,5±10,4	31,7±5,5	32,5±7,0	37,3±6,9
A2	23,1±8,0	9,4±11,3	9,2±15,2	12,6±13,5
A3	31,7±5,5	17,4±4,7	33,5±4,9	29,1±6,6
A4	30,3±6,4	12,6±2,5	11,2±3,9	12,5±6,4
B1	23,0±8,0	24,2±12,9	43,7±13,2	28,4±11,2
B2	15,7±14,5	15,7±14,6	35,2±15,2	33,0±4,4
B3	25,1±7,8	25,1±7,9	36,1±6,7	28,7±7,6
B4	11,4±6,9	11,5±7,0	24,2±10,4	21,9±9,9

Tabela 14 - Média e desvio-padrão da variável transformada consumo de oxigênio pelas mitocôndrias ($\mu\text{M de O}_2/\text{min.mg proteína.10}^{-3}$) no estado IV da respiração mitocondrial dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	6,8 $\pm$ 4,6	10,1 $\pm$ 1,8	13,0 $\pm$ 3,8	15,1 $\pm$ 2,8
A2	13,0 $\pm$ 4,3	8,2 $\pm$ 5,6	4,7 $\pm$ 5,7	7,0 $\pm$ 4,0
A3	10,1 $\pm$ 1,8	1,6 $\pm$ 2,4	11,5 $\pm$ 2,6	11,6 $\pm$ 3,1
A4	9,9 $\pm$ 1,8	9,0 $\pm$ 4,1	9,3 $\pm$ 2,7	11,1 $\pm$ 2,4
B1	13,3 $\pm$ 4,5	12,0 $\pm$ 5,4	16,6 $\pm$ 5,6	14,3 $\pm$ 5,6
B2	10,5 $\pm$ 6,9	10,5 $\pm$ 6,7	15,3 $\pm$ 8,0	18,1 $\pm$ 2,3
B3	9,7 $\pm$ 4,6	9,7 $\pm$ 4,4	11,3 $\pm$ 6,5	16,3 $\pm$ 3,8
B4	5,8 $\pm$ 5,5	5,8 $\pm$ 5,4	12,9 $\pm$ 4,2	15,1 $\pm$ 4,3

Tabela 15 - Média e desvio-padrão da variável transformada razão de controle respiratório (RCR) dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	3,6 $\pm$ 1,1	3,1 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 1,1
A2	1,6 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 0,6
A3	3,1 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,7
A4	3,1 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1
B1	1,6 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,4
B2	1,6 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5	2,20,9	1,5 $\pm$ 0,4
B3	2,5 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,3
B4	1,9 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,2

Tabela 16 - Média e desvio-padrão dos níveis de malondialdeído MAD (nmol/mg proteína) do conteúdo hepático dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	0,88±0,95	0,88±0,93	1,34±0,20	1,31±0,29
A2	1,22±0,14	1,00±0,19	1,07±0,12	1,23±0,13
A3	0,93±0,22	0,92±0,22	1,35±0,15	1,42±0,17
A4	0,99±0,20	0,99±0,21	1,41±0,17	1,36±0,31
B1	1,22±0,14	1,21±0,13	1,17±0,19	1,10±0,19
B2	1,22±0,13	1,23±0,14	1,18±0,19	1,17±0,18
B3	0,85±0,23	0,86±0,21	1,06±0,23	1,12±0,21
B4	0,92±0,12	0,85±0,23	1,20±0,16	1,02±0,22

Tabela 17 - Média e desvio-padrão dos níveis de glutathiona GSH (nmol/mg proteína) do conteúdo hepático dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	382,9±6,9	383,0±7,0	311,3±27,7	306,6±26,0
A2	422,5±36,5	426,6±31,3	341,9±10,6	356,1±28,3
A3	389,9±37,1	390,1±37,0	312,3±25,9	370,8±13,3
A4	382,05±41,6	382,03±41,7	284,78±33,9	300,5±68,1
B1	423,8±37,9	422,5±36,5	331,9±31,7	397,5±52,7
B2	422,3±36,6	422,1±36,5	348,1±36,2	392,7±23,8
B3	391,2±25,5	391,6±25,5	350,1±35,9	397,5±52,7
B4	391,6±25,5	391,5±25,7	408,08±24,7	314,4±43,6

Tabela 18- -Frequência (%) do grau de acometimento de congestão na biópsia hepática dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=66,7 leve=33,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=66,6 leve=33,4 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=66,6 leve=33,4 moderado=0,0 severo=0,0
A2	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0	ausente=16,6 leve=16,6 moderado=66,8 severo=0,0	ausente=0,0 leve=0,0 moderado=50,0 severo=50,0	ausente=0,0 leve=16,6 moderado=33,4 severo=50,0
A3	ausente=66,7 leve=33,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0
A4	ausente=33,3 leve=33,3 moderado=33,4 severo=0,0	ausente=66,6 leve=33,4 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=0,0 moderado=0,0 severo=100	ausente=16,6 leve=50,2 moderado=16,6 severo=16,6
B1	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=66,6 leve=33,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=50,0 moderada=16,7 severo=0,0
B2	ausente=16,6 leve=66,8 moderado=16,6 severo=0,0	ausente=16,6 leve=66,8 moderado=16,6 severo=0,0	ausente=0,0 leve=0,0 moderado=6,6 severa=83,4	ausente=0,0 leve=66,7 moderado=33,3 severo=0,0
B3	ausente=66,6 leve=33,4 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=66,7 leve=33,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=50,0 moderado=16,7 severo=0,0
B4	ausente=50,0 leve=16,7 moderado=33,3 severo=0,0	ausente=50,0 leve=16,7 moderado=33,3 severo=0,0	ausente=16,6 leve=16,6 moderado=0,0 severa=66,8	ausente=16,6 leve=16,6 moderado=16,6 severa=50,2

Tabela 19 - Frequência (%) do grau de acometimento de vacuolização citoplasmática na biópsia hepática dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperfusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de perfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	ausente=50,0 leve=33,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=50,0 leve=33,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0
A2	ausente=100,0 leve=0,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=50,0 moderado=16,6 severo=33,4	ausente=16,6 leve=50,0 moderado=33,4 severo=0,0
A3	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=50,0 leve=33,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=0,0 leve=66,7 moderado=33,3 severo=0,0
A4	ausente=33,3 leve=33,3 moderado=33,4 severo=0,0	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0
B1	ausente=100,0 leve=0,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,6 leve=50,0 moderado=33,4 severo=0,0
B2	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=16,6 moderado=66,8 severo=16,6	ausente=0,0 leve=50,0 moderado=50,0 severo=0,0
B3	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,6 leve=66,8 moderado=16,6 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0
B4	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=0,0 severo=16,7	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0

Tabela 20 - Frequência (%) do grau de acometimento de necrose na biópsia hepática dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-isquêmico (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperfusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	ausente=50,0 leve=33,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0
A2	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=66,7 leve=33,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0
A3	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=100,0 leve=0,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,6 leve=66,8 moderado=16,6 severo=0,0
A4	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=33,3 moderado=33,4 severo=0,0
B1	ausente=50,0 leve=50,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=100,0 leve=0,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0
B2	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0
B3	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=83,3 leve=16,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=66,6 moderado=16,7 severo=0,0
B4	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=100,0 leve=0,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0

Tabela 21 - Frequência (%) de polimorfonucleares neutrófilos na biópsia hepática dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (*WEB 2086*), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	ausente=50,0 leve=33,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0
A2	ausente=66,7 leve=33,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=0,0 leve=66,7 moderado=33,3 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0
A3	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=66,7 moderado=33,3 severo=0,0
A4	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=33,3 leve=66,7 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=33,3 leve=50,0 moderado=16,7 severo=0,0
B1	ausente=66,7 leve=33,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0
B2	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0
B3	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=83,3 moderado=16,7 severo=0,0	ausente=16,7 leve=66,6 moderado=16,7 severo=0,0
B4	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=0,0 leve=100,0 moderado=0,0 severo=0,0	ausente=16,7 leve=83,3 moderado=0,0 severo=0,0

Tabela 22 - Média e desvio-padrão dos níveis de pressão arterial média PAM (mmHg) dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (WEB 2086), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	104,3±11,3	118,6±14,2	109,3±14,8	101,6±23,9
A2	110,6±22,2	102,6±17,6	74,6±23,5	75,3±33,9
A3	122,6±9,6	116,6±17,6	110,0±25,0	100,3±28,8
A4	112,0±15,1	94,6±6,1	64,6±16,7	84,0±36,0
B1	104,0±	107,6±12,0	98,0±11,5	82,0±23,4
B2	115,3±11,1	106,6±38,3	99,0±29,7	90,6±25,2
B3	122,0±12,5	95,6±11,0	91,3±17,2	93,3±13,5
B4	134,6±13,6	112,3±17,9	103,3±15,2	89,3±30,1

Tabela 23 - Média e desvio-padrão dos níveis de pressão venosa central PVC (cmH₂O) dos animais dos grupos A (soro fisiológico) e B (WEB 2086), submetidos a 60 (A2 e B2) e 90 (A4 e B4) minutos de isquemia seletiva hepática e seus respectivos subgrupos controle aos 60 (A1 e B1) e 90 (A3 e B3) minutos nos tempos pré-isquêmico (C), pré-reperusão (R0), após 15 (R15) e 60 minutos de reperusão (R60).

	C	R0	R15	R60
A1	0,0±2,4	2,4±4,2	1,3±3,6	1,0±2,3
A2	-1,2±1,3	-1,3±3,3	0,0±3,4	0,5±3,4
A3	-1,0±1,0±	0,4±1,9	-2,0±2,9	0,8±1,4
A4	-1,9±1,9	-3,7±2,8	-2,8±3,1	-1,3±5,2
B1	1,2±2,7	0,9±3,0	1,1±3,4	-0,1±2,1
B2	0,9±2,0	-1,6±2,0	-2,0±2,1	-1,5±2,2
B3	-0,6±1,7	-0,8±2,1	-1,8±1,4	-1,2±1,3
B4	0,2±2,3	4,0±3,6	1,0±2,3	1,4±1,9