

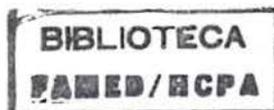
ERNANI LUIS RHODEN

**ISQUEMIA E REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA HEPÁTICA E
EFEITOS DO ALOPURINOL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para obtenção de título de Mestre em Medicina: Clínica Médica.

PORTO ALEGRE

1998



ERNANI LUIS RHODEN

**ISQUEMIA E REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA HEPÁTICA E
EFEITOS DO ALOPURINOL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Area de Concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira-Lima.

PORTO ALEGRE

1998

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rhoden, Ernani Luis

Isquemia e reperfusão normotérmica hepática e efeitos do alopurinol: Estudo experimental em ratos/ Ernani Luís Rhoden. -- Porto Alegre, 1997. 140p. :il

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Área de Concentração: Clínica Médica.

Orientador: Pereira-Lima, Luiz.

Descritores: 1.Radicais livres do oxigênio 2.Alopurinol 3.Isquemia e reperfusão hepática 4.Lipoperoxidação.

UFRGS/ HCPA.

MED
T
WI770 R737i 1998

05187509

[0272389] Rhoden, Ernani Luis. Isquemia e reperfusão normotérmica hepática e efeitos do alopurinol: estudo experimental em ratos. Porto Alegre : Autor, 1998. 140 f. : il.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Pereira-Lima

Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Geral da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Geral da Universidade Federal do Estado do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Doutor Livre-Docente em Cirurgia.

PENSAMENTO

"A pesquisa científica não se poderia excluir do ensino, pois é neste, é principalmente nele, que despontam, a cada passo, na complexidade dos fenômenos biológicos, nos mistérios infinitos da vida e da doença, fatos novos a interpretar, problemas obscuros a esclarecer. Nas enfermarias dos hospitais, nos laboratórios e institutos que as continuam, haveremos de transpor os confins das noções adquiridas, e penetrar nessa zona sem limites de hipóteses indecisas, de interpretações duvidosas, de incógnitas absolutas, em que se debate o espírito do pesquisador, observando ou experimentando, para criar a verdade e destruir o erro". (Carlos Chagas, 1928)

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, Danilo e Síría, por terem iluminado com amor os meus caminhos e sonhado com aquilo que sou.

A minha mulher Cláudia e, nossas filhas, Luiza e Fernanda, por terem tolerado o meu exagero e terem compreendido a minha ausência em muitos momentos de convívio.

AGRADECIMENTOS

Ao fim de uma jornada de trabalho, que neste caso representa a formação no Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), torna-se essencial o agradecimento àquelas pessoas, movidas por um objetivo comum, que de alguma forma colaboraram para a possibilidade de conclusão desta Dissertação.

À Professora Cláudia Ramos Rhoden, da Disciplina de Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), pela sua dedicação e incansável ajuda em todas as etapas fundamentais sobre as quais se baseiou a essência deste trabalho.

À Professora Doutora Helena Maria Tannhauser Barros, Chefe da Disciplina de Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), que colocando a disposição o Biotério da referida Disciplina, permitiu desta forma a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Cláudio Galeano Zettler, Disciplina de Patologia da FFFCMPA, pelo seu interesse, dedicação e disponibilidade, todas as vezes que lhe foi solicitado ajuda para avaliação histológica de vários trabalhos já efetuados com sua colaboração, e neste em especial pelo caráter de importância pessoal.

À Professora Doutora Adriane Belló-Klein, da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter colocado à disposição o laboratório da referida Disciplina, permitindo desta maneira que os experimentos que envolveram a medida das atividades radicais livres induzidas pudesse ser efetuada no referido laboratório.

Aos Professores e Colegas do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e, especialmente ao Professor Doutor Ellis D'Arrigo Busnello pelo incentivo e apoio tão essenciais para a concretização deste trabalho.

Agradecimento especial ao Acadêmico e Doutorando Marcelo Mauri, pela sua disposição e ajuda altamente especializada adquirida, principalmente nas técnicas laboratoriais, extremamente delicadas, que envolveram as medidas da lipoperoxidação e atividade radical livre. A sua dedicação, foi para mim, um exemplo de dedicação à pesquisa e, certamente, um grande futuro lhe aguarda.

Ao Acadêmico de Medicina Francisco Dalcanal pela sua disposição incansável, essencial para a realização das tarefas que envolveram a realização desta dissertação, principalmente no que se refere aos cuidados com os animais utilizados neste experimento.

À Farmacêutica-Bioquímica Maria Leticia Maya Vasques, do laboratório da Disciplina de Farmacologia da FFFCMPA, pela dedicação dispendida nas dosagens laboratoriais fundamentais neste trabalho.

Aos Funcionários do Biotério da FFFCMPA, Alexandre Maslinkiewicz e Mário Serapião Martins Pereira, pela sua pronta disponibilidade no atendimento às solicitações no que se refere ao fornecimento, seleção, preparo e cuidados com os animais utilizados neste experimento.

À Laboratorista Técnica em Patologia Terezinha Stein, pela dedicação dispendida na confecção das lâminas para avaliação histopatológica dos fígados.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Professor Doutor Luiz Pereira-Lima**, exemplo a ser seguido de interesse, dedicação e paixão pela atividade científica, certamente um dos motivos mais fortes da nossa aproximação profissional. Agradeço de modo especial ao Professor Pereira-Lima pelo incentivo sempre dispendido em situações que envolvessem empreitadas de cunho científico e por ter aceito o desafio de mais esta jornada. Certamente, à sua perpicácia e lucidez incomparáveis, vislumbraram a possibilidade, embora em um horizonte não tão imediato, o sucesso e o resultado de um trabalho realizado dentro de um planejamento cuidadosamente estabelecido. Às atitudes científicas e de amizade, suas características mais proeminentes no ponto de vista profissional e pessoal, respectivamente, sob o meu modo de ver, tornam o convívio extremamente agradável com o Professor Pereira-Lima e, certamente, outras oportunidades de trabalho compartilhadas virão.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	XV
Lista de figuras	XVI
Lista de gráficos	XVIII
Resumo	XX
Summary	XXVII
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - GENERALIDADES E TOXICIDADE DO OXIGÊNIO	1
1.2 - FONTES DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	7
1.3 - PRINCIPAIS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	7
1.4 - SÍTIOS DE AÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	15
1.5 - SISTEMAS DE DEFESA CONTRA AS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	17
1.6 - A ISQUEMIA REPERFUSÃO COMO FONTE DE ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	24
1.6.1 - Via da Xantina-oxidase	28
1.6.2 - Via do Óxido Nítrico e do Ácido Araquidônico	33
1.7 - EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLÓGICAS NO CONTROLE E EFEITOS DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	35

1.8 - EFEITO DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO NA INJÚRIA HEPÁTICA	39
1.9 - O ALOPURINOL COMO AGENTE PROTETOR CONTRA A AÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO	42
2 - OBJETIVOS	46
2.1 - PRINCIPAL	46
2.2 - SECUNDÁRIOS	46
3 - MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 - ANIMAIS	47
3.2 - FÁRMACOS	47
3.3 - ANATOMIA CIRÚRGICA DO FÍGADO DE RATOS	48
3.4 - TÉCNICA CIRÚRGICA DE ISQUEMIA HEPÁTICA EM RATOS	49
3.5 - TÉCNICA CIRÚRGICA DE HEPATECTOMIA EM RATOS	51
3.6 - EXPERIMENTOS REALIZADOS	52
3.6.1 EXPERIMENTO 1: Estudo da determinação da atividade das enzimas séricas hepáticas, transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT,TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (AST,TGO) e fosfatase alcalina (FA), em ratos submetidos a isquemia com ou sem hepatectomia	52
3.6.2 EXPERIMENTO 2: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares do hepatócitos, pelos Métodos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) e da Quimiluminescência (QL), de ratos submetidos a isquemia hepática em diferentes tempos de reperfusão sanguínea	55
3.6.3 EXPERIMENTO 3: Estudo das variações das atividades das enzimas transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT,TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (AST,TGO) e fosfatase alcalina(FA), assim como da mortalidade de ratos submetidos a isquemia hepática seletiva, tratados e não com alopurinol	61

3.6.4 EXPERIMENTO 4: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, pré-tratados e não com alopurinol	63
3.6.5 EXPERIMENTO 5: Avaliar a taxa de mortalidade de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol	65
3.6.6 EXPERIMENTO 6: Estudo das alterações histopatológicas dos fígados de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol, em diferentes períodos do pós-operatório	66
3.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
3.8 - NORMAS ÉTICAS ADOTADAS NO TRABALHO COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO	70
4 - RESULTADOS	71
4.1 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1: Estudo da determinação da atividade das enzimas séricas hepáticas, transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT, TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) e fosfatase alcalina (FA), em ratos submetidos a isquemia com ou sem hepatectomia	71
4.2 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares do hepatócitos, pelos Métodos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) e da Quimiluminescência (QL), de ratos submetidos a isquemia hepática em diferentes tempos de reperfusão sanguínea	76
4.3 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO 3: Estudo das variações das atividades das enzimas transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT, TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) e fosfatase alcalina(FA), assim como da	

mortalidade de ratos submetidos a isquemia hepática seletiva, tratados e não com alopurinol	80
4.4- RESULTADOS DO EXPERIMENTO 4: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, pré-tratados ou não com alopurinol	84
4.5 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 5: Avaliar a taxa de mortalidade de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol	88
4.6 - RESULTADOS DO EXPERIMENTO 6: Estudo das alterações histopatológicas do fígado de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol em diferentes períodos do pós-operatório	90
5 - DISCUSSÃO	98
6 - CONCLUSÕES	141
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
8 - ANEXOS	154

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP- Adenosina difosfatada.
- ALT(TGP)- Transaminase glutâmico oxalo-pirúvica.
- AMP- Adenosina monofosfata.
- Anova- Análise de variância.
- AST(TGO)- Transaminase glutâmico oxalo-acética.
- ATP- Adenosino trifosfatada.
- EAO- Espécies Ativas do Oxigênio.
- FA- Fosfatase alcalina.
- H₂O- Água.
- H₂O₂- Peróxido de hidrogênio.
- i.p.- Intraperitoneal.
- LPO- Lipoperoxidação.
- mg- Miligramas.
- min- Minutos.
- ml- Mililitros.
- $\cdot O_2^-$ - Radical superóxido.
- O₂⁻- Oxigênio molecular.
- $\cdot OH^-$ - Radical hidroxil.
- OH⁻- Hidroxila
- QL- Quimiluminescência.
- SOD- Superóxido dismutase.
- TBA-RS- Método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 - Mecanismo univalente para redução do oxigênio molecular a água	6
Figura 2 - Reação de Haber-Weiss	8
Figura 3 - Reação de Fenton	10
Figura 4 - Reação de redução, mediada por metais, do radical superóxido	11
Figura 5 - Etapas da lipoperoxidação de membranas celulares em cadeia	14
Figura 6 - Reação de dismutação pela superóxido dismutase	18
Figura 7 - Reação da catalase para detoxificação do radical superóxido	19
Figura 8 - Reação de hidroperóxidos pela glutathiona peroxidase	20
Figura 9 - Mecanismos endógenos de defesas enzimáticas para detoxificação de espécies ativas do oxigênio pela redução univalente do oxigênio molecular	21
Figura 10-Produção e reatividade de espécies ativas do oxigênio no meio intracelular	23
Figura 11-Esquema geral de formação de espécies radicais ativas do oxigênio em situações de isquemia e reperfusão	27
Figura 12-Principais rotas metabólicas envolvidas na geração de espécies ativas do oxigênio pela isquemia e reperfusão	32
Figura 13-Aspecto histopatológico de um fígado de rato normal (Hematoxilina Eosina) (80 aumentos)	93
Figura 14-Aspecto histopatológico de um fígado de rato normal (Hematoxilina Eosina) (100 aumentos)	93
Figura 15-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 24 horas após	

isquemia onde pode-se observar a presença de congestão ao nível da veia centrolobular (Picrocilius) (100 aumentos)	94
Figura 16-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 24 horas após a isquemia onde pode-se observar a presença de congestão ao nível do espaço porta (Picrocilius) (200 aumentos)	94
Figura 17-Aspecto histopatológico de fígado de rato 24 h após isquemia e tratamento com alopurinol onde se pode observar a presença de congestão da veia centrolobular (Hematoxilina iosina) (200 aumentos)	95
Figura 18-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 24 h após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar congestão ao nível do espaço porta (Picrocilius) (200 aumentos).	95
Figura 19-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 48 horas após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (100 aumentos)	96
Figura 20-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 48 horas após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (200 aumentos)	96
Figura 21-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 48 horas após isquemia onde pode-se observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (100 aumentos)	97
Figura 22-Aspecto histopatológico de fígado de rato 48 horas após isquemia onde pode-se observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (200 aumentos)	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
Gráfico 1- Representação gráfica da variação na concentração sérica da enzima transaminase glutâmico pirúvica (ALT, TGP) em diferentes períodos de tempo, após os diferentes procedimentos cirúrgicos hepáticos efetuados em ratos	73
Gráfico 2- Representação gráfica da variação na concentração sérica da enzima transaminase glutâmico oxalacética (AST, TGO) em diferentes períodos de tempo após os diferentes procedimentos cirúrgicos hepáticos efetuados em ratos	74
Gráfico 3- Representação gráfica da variação na concentração sérica da enzima fosfatase alcalina (FA) em diferentes períodos de tempo após os diferentes procedimentos cirúrgicos hepáticos efetuados em ratos	75
Gráfico 4- Representação gráfica do perfil cinético da quimiluminescência, iniciada por hidroperóxido de tert-butil, das médias da máxima emissão de energia luminosa pelo tecidos hepáticos dos diferentes grupos de animais	79
Gráfico 5- Representação gráfica da variação na concentração sérica da enzima transaminase glutâmico pirúvica (ALT, TGP) após o procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão hepática em ratos tratados, e não, com alopurinol	81
Gráfico 6- Representação gráfica da variação na concentração sérica da enzima transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) após o procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão hepática em ratos tratados, e não com alopurinol.	82

- Gráfico 7- Representação gráfica da variação na concentração sérica da enzima fosfatase alcalina (FA) após o procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão em ratos tratados, e não, com alopurinol . 83
- Gráfico 8- Representação gráfica do perfil cinético da quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil, em tecido hepático de ratos tratados ou não com alopurinol e submetidos a isquemia e reperfusão do fígado. 87

RESUMO

Evidências acumuladas em diversos estudos tem demonstrado que as Espécies Ativas do Oxigênio (EAO) contribuem para o dano celular decorrente da isquemia e reperfusão de órgãos, principalmente, em função da propriedade oxidativa das mesmas sobre os constituintes lipídicos das membranas celulares. O alopurinol tem sido sugerido como droga capaz de interferir benéficamente diminuindo o dano celular decorrente da reperfusão de órgãos previamente isquêmicos, tendo em vista o seu potencial de inibir a enzima xantina-oxidase, a mais frequentemente referida como geradora de EAO.

Este estudo foi desenvolvido como o objetivo de avaliar os efeitos da isquemia e reperfusão hepática em ratos e também os efeitos do pré-tratamento com o alopurinol, sobre a função deste órgão, lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos e, características histopatológicas decorrentes.

Para tanto, ratos Wistar, pesando entre 250 e 300 gramas foram utilizados e divididos em 6 experimentos interdependentes.

Experimento 1: realizado para avaliar os efeitos de diferentes procedimentos sobre a função hepática. Os animais foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada: Grupo 1- ratos controle; Grupo 2- ratos submetidos a isquemia troncular total e intermitente durante um tempo de 45 minutos, tendo sido permitida a reperfusão durante 5 minutos após os dois primeiros intervalos de 15 minutos; Grupo 3- ratos submetidos a hepatectomia parcial (lobo médio e esquerdo); Grupo 4- ratos submetidos a isquemia conforme descrito e, no final do período, a hepatectomia parcial como no grupo anterior. Colheitas de sangue 12, 24, 48, 72, 96, 120 horas e no 14, 21 e 28 dias foram obtidas para determinação da atividade das transaminases oxalo-pirúvicas (ALT), oxaloacética (AST) e fosfatase alcalina (FA).

Experimento 2: realizado para avaliar o grau de lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos, através dos métodos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e da Quimiluminescência (QL), em diferentes tempos de reperfusão sanguínea. Para tanto, 40 ratos foram utilizados e divididos em 4 grupos de 10 animais cada: Grupo 1: ratos controle (submetidos a laparotomia); Grupo 2- ratos submetidos a isquemia total durante 60 minutos não tendo sido permitida a reperfusão; Grupo 3- Isquemia total de 60 minutos e reperfusão por 30 minutos; Grupo 4- Isquemia total de 60 minutos e reperfusão por igual tempo. A ressecção do lobo médio, ao final

de cada tempo operatório, foi realizada e, o tecido removido utilizado para medidas do grau de lipoperoxidação pelos métodos do TBARS e QL.

Experimento 3: realizado para avaliar os efeitos do alopurinol sobre a função hepática em situações de isquemia e reperfusão. Para tanto 30 ratos foram utilizados, e divididos em 3 grupos de 10 animais cada: Grupo 1- ratos controle, submetidos ao pré-tratamento com 50 mg/ Kg de peso da suspensão de alopurinol 5 e 1 hora antes da laparotomia, sem nenhum procedimento adicional; Grupo 2- Isquemia seletiva do lobo médio e esquerdo durante 45 minutos, porém em ratos pré-tratados com suspensão de alopurinol nas doses descritas anteriormente; Grupo 3- ratos submetidos a isquemia seletiva conforme descrito anteriormente. Medidas da ALT, AST e FA foram realizadas 12, 24, 48 e 72 horas após os procedimentos.

Experimento 4: avaliar o efeito do alopurinol sobre o grau de lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos. Para tanto, 30 ratos foram utilizados e divididos em 3 grupos com 10 animais cada: Grupo 1- ratos controle, submetidos a um período de anestesia e laparotomia de 1 hora e 45 minutos; Grupo 2- ratos submetidos a isquemia de 45 minutos e reperfusão de 1 hora porém, pré-tratados com suspensão de alopurinol conforme descrição prévia. Grupo 3- ratos submetidos a isquemia de 45 minutos e reperfusão de 1 hora. Após os respectivos tempos operatórios, os animais foram submetidos a ressecção do lobo médio, utilizado para as medidas da lipoperoxidação pelos métodos do TBARS e QL.

Experimento 5: avaliar os efeitos do alopurinol sobre a mortalidade pós-operatória em ratos submetidos a isquemia e reperfusão. Para tanto, 30 ratos foram utilizados e divididos em 3 grupos: Grupo 1- ratos controle, submetidos ao pré-tratamento com 50 mg/ Kg de peso da suspensão de alopurinol 5 e 1 hora antes da laparotomia, sem nenhum procedimento adicional; Grupo 2- ratos submetidos a isquemia seletiva do lobo médio e esquerdo durante 45 minutos, porém com pré-tratamento com suspensão de alopurinol nas doses descritas anteriormente. Grupo 3- Isquemia seletiva conforme descrito anteriormente.

Experimento 6: avaliar as alterações histopatológicas da isquemia hepática em ratos pré-tratados e não com alopurinol. Para tanto, 60 ratos foram utilizados e divididos em 3 grupos de 20 animais: Grupo 1- ratos controle, submetidos ao pré-tratamento com 50 mg/ Kg de peso da suspensão de alopurinol 5 e 1 hora antes da laparotomia, sem nenhum procedimento adicional; Grupo 2- ratos submetidos a isquemia seletiva do lobo médio e esquerdo, durante 45 minutos, porém em ratos pré-tratados com suspensão de alopurinol nas doses descritas anteriormente. Grupo 3- Isquemia seletiva conforme descrito anteriormente. A cada 24 horas durante 4 dias, 5 animais de cada grupo eram sacrificados e, os lobos médio e esquerdo foram removidos para estudo histopatológico.

Experimento 1- Significativa elevação nas concentrações séricas, nas medidas das 12 e 24 horas após o procedimento, das enzimas ALT e AST

foram observadas nos Grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle (Grupo 1) ($p < 0.05$). Além disso, naqueles animais do Grupo 4 elevações mais pronunciadas foram evidenciadas em relação aos demais grupos nas determinações efetuadas 12, 24 e 48 após a cirurgia ($p < 0.05$). A soma dos valores das medidas individuais dos Grupos 2 e 3 não se distinguiram daquelas obtidas no Grupo 4 ($p > 0.05$). A concentração sérica da FA foi mais elevada em todas as determinações efetuadas naqueles animais submetidos a hepatectomia (G.3 e 4) em relação aos grupos de animais nos quais este procedimento não foi efetuado (Grupos 1 e 2) ($p < 0.05$).

Experimento 2- Foi observado uma maior formação de malondialdeído (TBARS) nos tecidos hepáticos dos Grupos 3 e 4 em relação aos Grupos 1 e 2 ($p < 0.05$) e, além disso, ausência de diferença entre os Grupos 3 e 4 e entre os Grupos 1 e 2 ($p > 0.05$). Resultados semelhantes foram obtidos pelo método da QL.

Experimento 3- A concentração sérica da ALT e AST foi superior ($p < 0.05$) nos Grupos 2 e 3 em relação ao grupo controle (Grupo 1) nas medidas efetuadas 12 e 24 horas após o procedimento e, nas determinações das 48 horas do Grupo 3 em relação aos demais ($p < 0.05$). A FA foi semelhante em todos os grupos de animais ($p > 0.05$).

Experimento 4- A formação de malondialdeído foi maior nos animais do Grupo 3 em relação aos Grupos 1 e 2 ($p < 0.05$). Entre estes dois últimos grupos não houve diferença estatisticamente detectável ($p > 0.05$). Além disso, a QL

demonstrou uma maior emissão de energia luminosa no Grupo 3 em relação aos demais ($p < 0.05$) e, entre estes dois últimos os resultados foram semelhantes ($p > 0.05$).

Experimento 5- A taxa de mortalidade no grupo de animais submetidos a isquemia sem pré-tratamento como alopurinol (Grupo 3) foi de 40% nas primeiras 24h após o procedimento, estatisticamente distinta quando comparado ao Grupo 1 (controle) ($p < 0.05$). Entretanto, entre os animais do Grupo 2, ou seja, submetidos a isquemia e pré-tratamento com alopurinol, 13.3% foram ao óbito e este valor não se distingue dos animais do Grupo 1 ($p > 0.05$). A avaliação entre os Grupos 2 e 3 não demonstrou diferença estatística ($p > 0.05$). A mortalidade na avaliação das 48 horas foi igual entre os dois grupos (6.6% e 6.6%) (2 e 3) e não distintas, estatisticamente ($p > 0.05$). Os demais animais sobreviveram durante o período de observação.

Experimento 6- Congestão vascular hepática e necrose hepatocitária foram significativamente mais pronunciadas nos animais dos Grupos 2 e 3 em relação aos animais do grupo controle na avaliação efetuada 24 e 48 horas após a isquemia ($p < 0.05$) e, além disso, a necrose foi maior nos animais do Grupo 3 em relação aos do Grupo 2 ($p < 0.05$) apenas na avaliação das primeiras 24 horas após o procedimento cirúrgico. Não se observaram diferenças estatisticamente demonstráveis nas avaliações realizadas 72 e 96 horas após a cirurgia ($p > 0.05$).

Estes resultados sugerem que a via da xantina oxidase é uma das mais importantes rotas metabólicas envolvidas na geração de EAO, elementos quimicamente reativos e com potencial lesivo ao nível das membranas celulares dos hepatócitos e, que pelo menos em parte, são responsáveis pelos danos funcionais do fígado na síndrome da isquemia e reperfusão. Além disso, o alopurinol demonstrou efeitos protetores contra a lipoperoxidação decorrente da injúria reperfusional, embora a análise histopatológica não tenha demonstrado uma diferença estatisticamente significativa, o que pode ser justificado pelo fato das alterações provocadas nesta síndrome ocorrerem a nível de biomembranas celulares e de organelas não adequadamente visualizáveis pela microscopia óptica.

SUMMARY

It has been demonstrated that the oxygen free radical (EAO) contributes to the cellular damage induced by ischemia/reperfusion, probably mainly due to its lipid-oxidative characteristics. It has been suggested that allopurinol has beneficial effects in reducing the injury due to the reperfusion of previously ischemic organs, in this syndrome, as a result of its property of inhibiting the enzyme xanthine oxidase, most frequently referred as responsible for the EAO generation.

This study was carried out with the purpose of elucidating the effects of hepatic ischemia-reperfusion in rats, the effects of allopurinol in this syndrome, the development of the assay for lipid peroxidation of hepatocyte membranes and the histopathologic features.

To achieve this goal, the functional repercussion and the histopathologic features (analyzed 24 hours and eight days after surgery) were evaluated in wistar rats weighing 250–300 g.

Experiment 1: performed for evaluating the way in which different procedures reflected upon the hepatic function. The animals were divided into 4 groups of 10 rats each. Group 1- Controls (sham operation); Group 2- rats submitted to total intermittent hepatic ischemia for 45 minutes: the first two 15-minute

periods of ischemia were intercalated with 5 minutes of reperfusion; Group 3- rats which underwent partial hepatectomy (medial and left lobes). Group 4- Ischemia as described above and at the end of partial hepatectomy. Blood samples were obtained at 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours and 4, 21 and 28 days after the procedure to determine the levels of the enzymes oxalopiruvic transaminase (ALT), oxaloacetic transaminase (AST) and alkaline phosphatase (AF).

Experiment 2: performed for evaluating the lipoperoxidation of hepatocyte membranes by the methods of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and Chemoluminescence (QL) at different times of reperfusion. The animals were divided into 4 groups of 10 rats each: Group 1- Controls (sham operation); Group 2- rats submitted to total hepatic ischemia for 60 minutes ; Group 3- total hepatic ischemia for 60 minutes and reperfusion for 30 minutes; Group 4- total hepatic ischemia for 60 minutes and reperfusion for 60 minutes. At the end of each operation time, a resection of the medial lobe was performed, and hepatic tissue was removed and used for measuring lipid peroxidation by the methods described above.

Experiment 3: performed for evaluating the effects of allopurinol on hepatic function in the setting of ischemia-reperfusion. The animals were divided into 3 groups of 10 rats each: Group 1- Controls (sham operation) treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 2- rats submitted to selective (medial and left lobes) hepatic ischemia during 45 minutes and treated 5 hours

and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 3- rats submitted to 45 minutes of selective (medial and left lobes) hepatic ischemia followed by 5 minutes of reperfusion 22,5 minutes later. Blood samples were obtained 12, 24, 48 and 72 hours after the procedure to determine the activities of the ALT, AST and AF enzymes.

Experiment 4: performed for evaluating the effects of allopurinol on hepatocyte membrane lipoperoxidation by the methods of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and Chemoluminescence (QL). The animals were divided into 3 groups of 10 rats each: Group 1- Controls (sham operation) treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 2- rats submitted to 45 minutes of selective (medial and left lobes) hepatic ischemia followed by 60 minutes of reperfusion and treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 3- rats submitted to selective (medial and left lobes) hepatic ischemia during 45 minutes and reperfusion during 60 minutes. After the respective surgical times, the left and medial lobes were removed and used for the lipoperoxidation assay by the TBARS and QL methods.

Experiment 5: performed for evaluating the effects of allopurinol on mortality after the ischemia-reperfusion procedure. Forty animals were used and divided into 3 groups: Group 1- 10 control rats (sham operation) treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol

suspension administered intraperitoneally; Group 2- 15 rats submitted to selective (medial and left lobes) hepatic ischemia during 45 minutes and treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 3: 15 rats submitted to 45 minutes of selective (medial and left lobes) hepatic ischemia followed by 5 minutes of reperfusion 22,5 minutes later. The animals were observed for 7 days after the procedure.

Experiment 6: performed for analyzing the hepatic histopathologic features and the effects of the pre-treatment with allopurinol in the rats submitted to ischemia-reperfusion. Sixty animals were used and divided into three groups of twenty animals each: Group 1- Control rats (sham operation) treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 2- rats submitted to selective (medial and left lobes) hepatic ischemia during 45 minutes and treated 5 hours and 1 hour before the procedure with two doses of 50 mg/kg of allopurinol suspension administered intraperitoneally; Group 3- rats submitted to selective (medial and left lobes) hepatic ischemia during 45 minutes. Twenty-four, 48, 72 and 96 hours after the procedure, 5 rats of each group were sacrificed, and their left and right lobes were removed for histopathologic study (vascular congestion, necrosis and steatosis).

Experiment 1: The determination of the ALT and AST levels, after the procedure, demonstrated that these levels were significantly higher in the

groups 2 and 3 than in group 1 ($p < 0,05$). Besides, among the animals of all groups, those of group 4 had the highest levels 12, 24 and 48 hours after the surgery. When the values of group 3 were added to the values of group 2, the results were not different from the values of group 4 ($p > 0,05$). AF was higher in all determinations, in the animals which underwent hepatectomy (groups 3 and 4) compared to those which were not submitted to this procedure (groups 1 and 2) ($p < 0,05$).

Experiment 2: Malondialdehyde (TBARS) formation was higher in the groups 3 and 4 than in the groups 1 and 2 ($p < 0,05$); besides, no difference was observed between the groups 3 and 4 and between the groups 1 and 2 ($p > 0,05$). Similar results were observed with the QL method.

Experiment 3: The levels of ALT and AST measured 12 and 24 hours after the procedure were higher in the groups 2 and 3 compared with group 1 ($p < 0,05$). The determinations made 48 hours after the procedure showed a higher level only in group 3 ($p < 0,05$). The AF concentration was the same in all groups ($p < 0,05$).

Experiment 4: Malondialdehyde formation was higher in the animals of group 3 compared with those of the groups 1 and 2 ($p < 0,105$). No statistical difference was observed between the last two groups ($p > 0,05$). Besides, QL showed a

higher energy emission in group 3 than in the groups 1 and 2 ($p < 0,05$) with similar results between these two groups ($p > 0,05$).

Experiment 5: Global mortality was 0, 20 and 46,7% in the groups 1, 2 and 3, respectively. Forty per cent of the animals of group 3 died within the first 24 hours after the procedure and this percentage was significantly different from that of the control group (1) ($p < 0,05$). However, 13,3% of the rats of group 2 (previously treated with allopurinol) died within the same period, and such rate was not different from that of group 1 ($p > 0,05$). No statistical difference was observed between the groups 2 and 3 ($p > 0,05$). Forty-eight hours after the procedure, one additional rat of each group (2 and 3) died, and thereafter all animals survived within the observation period.

Experiment 6: With regard to the histopathologic features, significant vascular congestion and hepatic necrosis were observed 24 and 48 hours after the procedure in the groups 2 and 3 ($p < 0,05$). Necrosis was more prominent in group 3 than in group 2, within the first 24 hours ($p < 0,05$). No significant differences were observed at the 72-hour and 96-hour analyses.

These results suggest that the enzyme xanthine oxidase is one of the most important pathways involved in the generation of the EAOs, chemical reactive elements with injury potential at the level of the hepatocyte membranes in the ischemia-reperfusion syndrome. At last, the results showed

that allopurinol had beneficial effects on hepatic function and lipid peroxidation and protective effects against hepatic ischemia-reperfusion injury. The histopathologic findings can be explained by the fact that the changes induced by this mechanism occur in organelles and biomembranes which are not visualized by light microscopy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES E TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

Vários são os fatores que têm sido postulados como causa do dano relacionado a isquemia e reperfusão de órgãos. Entre tais fatores citam-se a formação de espécies ativas do oxigênio (EAO), influxo celular de cálcio, depleção do trifosfato de adenosina (ATP) e a disfunção mitocondrial. Vários autores (BUEGE & AUST, 1978; HASSELGREN, 1987; GONZALES-FLECHA, LLESUI, BOVERIS, 1991) têm demonstrado que a isquemia hepática seguida da reperfusão causa um rápido aumento na tensão tecidual de oxigênio, que promove a lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos com conseqüente lesão celular.

As EAO podem estar implicadas como elementos fisiopatológicos, destacando-se, entre estes, agentes tóxicos exógenos (radiação ionizante, agentes quimioterápicos, tetracloreto de carbono, paraquat, carcinógenos químicos), síndromes de hiperoxigenação (toxicidade pulmonar por oxigênio

hiperbárico, fibroplasia retrolental) síndromes isquêmico-reperfusionais (infarto do miocárdio, cardioplegia cirúrgica, preservação de órgãos para transplantes, isquemia intestinal, enterocolite necrotizante, isquemia cerebral, transferência de retalhos livres de pele e músculos), desordens inflamatórias (glomerulonefrites, vasculites e doenças auto-imunes), choque hemorrágico, sobrecarga de ferro (hemocromatose, talassemias), deficiências nutricionais, álcool, câncer e amiloidose, entre outros (OHKAWA et al., 1979; GERSCHMAN, 1981; PARKS et al., 1983; CROSS et al., 1987; PUNCH et al., 1992; NILSSON et al., 1993; POLI, 1993; WILLET et al., 1995). Doenças dos sistemas sangüíneo, respiratório, cardiovascular, urinário, gastrintestinal, nervoso central, visual e cutâneo têm sido referidas como tendo associação ou mediação por EAO (ABROSIO et al., 1995; ORTOLANI et al., 1995; BOROS et al., 1995).

O envolvimento das EAO em diversos processos fisiológicos parece ser inequívoca. Este aspecto reside no fato de a vida ter surgido espontaneamente há 3,5 bilhões de anos, decorrente de reações que se processaram a partir de aminoácidos, nucleotídeos e outros elementos químicos, produzidas pela simples redução de elementos da atmosfera primitiva, mediados por espécies radicais, iniciadas principalmente pela energia solar (ROSENBLUM et al., 1989). Fato que sustenta esta teoria é o fenômeno de que as algas surgiram há cerca de 2,5 bilhões de anos e começaram o processo de liberação do

oxigênio para a atmosfera através da síntese de glicose, via fotossíntese, utilizando como fonte energética a luz solar. A geração de oxigênio molecular como bio-produto, levou a um aumento progressivo deste elemento na composição do ar atmosférico e como consequência ocasionou que apenas níveis de radiações solares compatíveis com a vida, pudessem atingir a superfície terrestre há cerca de 500 milhões de anos (ROSENBLUM et al.,1989). Inicialmente, estas células metabolizavam a glicose anaerobicamente, obtendo energia através de um processo conhecido como fermentação, entretanto, a partir da fotossíntese, estas estruturas foram obrigadas a desenvolver mecanismos de controle da toxicidade do oxigênio através de modificações intra e extracelulares (BULKEY, 1983). Portanto, é provável que no intervalo de tempo de 3 bilhões de anos, mecanismos contra a ação das EAO foram desenvolvidas pelas formas primitivas de vida de modo a permitir a sua sobrevivência em um ambiente rico em oxigênio (ROSENBLUM et al.,1989).

A toxicidade do oxigênio foi descrita de forma quase simultânea a sua descoberta como componente químico do ar por Priestley em 1774, e em 1783 Lavoisier provou que o oxigênio hiperbárico apresentava efeitos maléficos sobre os pulmões (BELLO-KLEIN,1994). Entretanto, as bases da toxicidade do oxigênio foram estabelecidas apenas em 1871 por Paul Bert ao expôr plantas e

animais a altas concentrações dele, com a demonstração de efeitos deletérios de uma maneira universal (apud BELLO-KLEIN, 1994)

Atualmente, está claramente estabelecido que processos enzimáticos e não-enzimáticos que ocorrem em nível celular, permeados pelo oxigênio, levam a uma contínua produção de EAO, que necessita ser detoxificada pelo organismo, em função do seu potencial efeito lesivo. (MENEZHINI, 1987; CROSS et al., 1987; ABROSIO et al., 1995).

A redução completa do oxigênio a água é o mecanismo de controle desenvolvido pelos seres aeróbios sobre este elemento, de modo que a compreensão destas etapas é fundamental no que se refere à formação das EAO (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983). Esta redução envolve a adição de quatro elétrons a cada molécula de oxigênio, podendo este processo ocorrer de forma tetra ou monovalente (BULKEY, 1983). Na primeira situação, é responsável pela redução de 95% do oxigênio, que recebe quatro elétrons de uma só vez, formando água, sendo esta reação mediada pela via da citocromo oxidase e utilizada para gerar a adenosina trifosfato (ATP), processo conhecido, também, como glicólise aeróbica (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983). Nos 5% restantes, o processo ocorre de forma monovalente, isto é, o O_2 recebe um elétron de cada vez (mono, di e tri-redução) formando

uma série de elementos intermediários tóxicos e reativos denominados EAO, cujos principais representantes são o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), respectivamente (DEL MAESTRO, 1980; McCORD, 1983; FRANSSEN et al., 1995) (Figura 1). Estes são também conhecidos como radicais livres de oxigênio, denominação não totalmente correta, tendo em vista que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é uma espécie radical. Assim, entende-se por radical livre qualquer espécie química capaz de existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (McCORD, 1983; CROSS et al., 1987; ABROSIO et al., 1995). Logo, inclui vários outros radicais, como do átomo de hidrogênio, de íons de metais de transição, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, etc. (CROSS et al., 1987).

As EAO podem ser formadas pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical, de forma a ficar em um elétron desemparelhado, gerando instabilidade química e grande poder de reação (BULKEY, 1983; MENEGHINI, 1987).

Cabe ressaltar que a toxicidade do oxigênio não se deve apenas aos radicais livres dele derivados, mas também a outros estados do oxigênio, como H_2O_2 e o oxigênio singlet (estado excitado do oxigênio molecular). Neste

estado, ele pode se apresentar sob duas formas: sigma (mais reativo, pois possui 2 elétrons desemparelhados) e delta (menos reativo, pois não apresenta elétrons desemparelhados). A descoberta de enzimas (superóxido dismutase) que atuam especificamente diminuindo este radical em células aeróbicas sustenta a teoria de que o superóxido é o grande responsável pela toxicidade do oxigênio, já que estas enzimas são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos na presença de O_2 (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; McCORD, 1983). Na realidade as EAO e os mecanismos de controle ou remoção das mesmas podem ter sido elementos fundamentais que nortearam o processo evolutivo das espécies quando da presença inicial de oxigênio na atmosfera (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983).

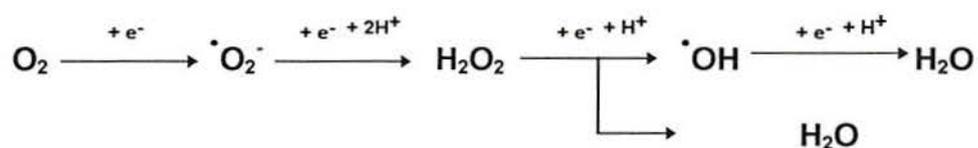


Figura 1- Mecanismo univalente para redução do oxigênio molecular em água: Por uma série de transferências de elétrons isolados, o oxigênio molecular é reduzido inicialmente em radical superóxido ($\cdot O_2^-$) e deste, com a adição de mais dois elétrons, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Finalmente, a adição de mais um elétron e a reação com um próton de hidrogênio do meio, leva à formação de água e o potente radical hidroxil ($\cdot OH$). A redução final univalente e a adição de outro próton converte o radical hidroxil em água. Os radicais $\cdot O_2^-$ e $\cdot OH$ são espécies ativas do oxigênio (EAO), cada uma contendo, por definição, um elétron desemparelhado em sua camada mais externa, o que lhes proporciona uma potente atividade reativa. (Adaptado de DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492: 153-68, 1980).

1.2 FONTE DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO(EAO)

As principais fontes das EAO nos seres vivos aeróbicos, podem ser divididas em endógenas e exógenas (DEL MAESTRO, 1980; CROSS et al., 1987). Entre as primeiras, temos a atividade mitocondrial (cadeia de transporte de elétrons), microssomal (cadeia de transporte de elétrons), dos cloroplastos (cadeia de transporte de elétrons), das enzimas oxidantes (xantina oxidase, ciclo-oxigenase, lipo-oxigenase, monoamino-oxidase, galactose-oxidase), das células fagocíticas(neutrófilos, monócitos, macrófagos) e das reações auto-oxidantes(Fe^{2+} , adrenalina), entre outras (GRENE & PALLER, 1992). Entre as fontes exógenas destacam-se as substâncias com potencial redox (paraquat, doxorubicina entre outras) , drogas oxidantes (paracetamol, tetracloreto de carbono), fumo, radiação ionizante, luz solar e substâncias oxidantes da glutathiona) (CROSS et al., 1987; POLI, 1993).

1.3 PRINCIPAIS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

São basicamente três as principais EAO decorrentes do metabolismo aeróbico, ou seja: o radical superóxido (O_2^-) , o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e



o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; MATIELI, 1994; NUNES et al., 1995).

O radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) pode atuar como agente redutor, doando o seu elétron excedente, ou como agente oxidante, situação na qual recebe elétrons e é reduzido a água (DEL MAESTRO, 1980; NUNES et al., 1995). A sua principal atividade citotóxica resulta de um ataque direto ou indireto em nível molecular pelo próprio radical ou, secundariamente, através da geração de outros radicais (H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$), como, por exemplo, a reação catalisada por metais que leva a formação do potente radical $\cdot\text{OH}$ através da reação de Haber-Weiss (Figura 2) (McCORD, 1983).



Figura 2- Reação de Haber-Weiss: demonstra a interação entre o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) numa reação catalisada por metais de transição, como por exemplo o ferro da hemoglobina, originando o potente radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), oxigênio molecular (O_2) e a hidroxila (OH^-) (Adaptado de DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492 p.153-68, 1980).

Por outro lado, também pode reagir com lipídeos hidroperóxidos para formar radicais alcóxil ($\text{RO}\cdot$) (BULKEY, 1983). A mais importante reação que

envolve o $\cdot O_2^-$ é a sua dismutação a $H_2 O_2$ (DEL MAESTRO, 1980; MENECHINI, 1987). É importante salientar que células inflamatórias possuem na sua superfície NADPH redutase, que catalisa a formação de $\cdot O_2^-$. Parte desta produção é liberada para o meio extra-celular, onde pode ocorrer uma dismutação espontânea, originando H_2O_2 (NUNES et al.,1995). A habilidade destas células de promover estas reações é um importante fator para a morte de bactérias, uma vez que, em indivíduos nos quais estas não ocorrem como por exemplo na doença granulomatosa crônica, infecções recorrentes são freqüentes (BULKEY, 1983; MENECHINI, 1987). Entretanto, o mecanismo da atividade bactericida ainda não está completamente esclarecido, mas relaciona-se, possivelmente, à formação de outras EAO (radical hidroxil e oxigênio singlet) e hipoclorito (MENECHINI,1987) .

A formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ocorrer por processo direto ou indireto (DEL MAESTRO, 1980; NUNES et al.,1995). O primeiro relaciona-se à ação de oxidases encontradas nos peroxissomas (D-aminoácido oxidase, xantina oxidase, uricase, alfa-hidroxiácido oxidase e glicolato oxidase) envolvidas nas reações de oxidação de ácidos graxos, produção de hormônios esteróides, produção de lipídios em glândulas sebáceas, fagocitose, termogênese, etc., correspondendo a uma redução divalente do O_2 (DEL MAESTRO, 1980). O segundo processo relaciona-se à

dismutação do ânion radical superóxido previamente, formado através da redução univalente do O_2 , resultante da oxidação aeróbica de substratos com subsequente ação da SOD. Entretanto, existem ainda controvérsias sobre a real toxicidade do H_2O_2 . Sua toxicidade pode ser demonstrada em diferentes sistemas celulares. Entretanto, no momento, enfatiza-se que esta EAO pura não é reativa (WILLET et al., 1995). Por outro lado, a sua toxicidade se tornaria relevante quando ocorre o seu contato com formas reduzidas de metais de transição (Fe^{+2} ou Cu^{+1}), originando o radical hidroxil, através da reação de Fenton (Figura 3) (MENEHINI 1987; NUNES et al., 1995).

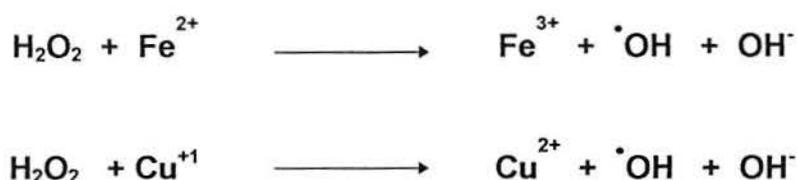


Figura 3- Reação de Fenton: mecanismo de geração do potente radical hidroxil ($\cdot OH$) através da reação do radical H_2O_2 com metais de transição como o íon ferroso (derivado da ferritina, mioglobina e hemoglobina) e cuproso. (DEL MAESTRO, RF: An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, 492: 153-168, 1980)

O ferro presente na ferritina e transferrina ou aquele presente em proteínas funcionais como hemoglobina, mioglobina contribuem para a reação acima citada (MENEHINI, 1987; FRANSSEN et al, 1995; FREDERIKS et al., 1995). Entretanto, complexos de ferro de baixo peso molecular, como citrato de ferro ou Fe-ATP são provavelmente os maiores catalisadores desta reação "in vivo" e estão presentes, em maior concentração, no meio intracelular e

pouco nos fluidos extracelulares, como o fluido sinovial e líquido em humanos (KARWINSKI et al.,1993; LEFEBVRE et al.,1995). De forma semelhante, íons de cobre ligados às proteínas não catalisam a reação de formação do radical hidroxil, somente os complexos de cobre com baixo peso molecular, presentes inclusive no líquido, teriam esta propriedade (Figura 4) (CUNNINGHAM et al.,1974; BULKEY, 1983; CROSS et al.,1987).

O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) reage com uma grande quantidade de componentes orgânicos, sendo o seu tempo de meia vida é extremamente curto e sua toxicidade pode ser mediada através de componentes dependentes de OH^\cdot , tais como, radical ânion carbonato ou por produtos de OH^\cdot induzidos, com os lipídeos ou outros componentes celulares (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; BELLO-KLEIN,1994; NUNES et al.,1995).

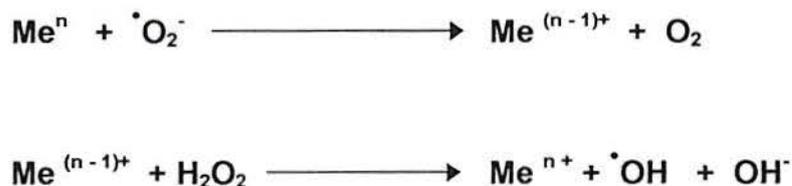


Figura 4 - Redução mediada por metais (Me^n) do radical superóxido seguido de uma reação tipo Fenton para geração do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$). (Adaptado: DEL MAESTRO, RF: An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492 p. 153-68, 1980).

A reatividade das EAO varia, sendo algumas altamente estáveis (H_2O_2), e a maioria tendendo a ser extremamente reativas e instáveis (MENECHINI,1987). Apresentam uma vida média muito curta e, devido a sua reatividade, a maioria dos radicais existe apenas em baixas concentrações (10^{-4} a 10^{-9}M). Além disso, não se distanciam de seu sítio de formação. Entretanto, reações à distância com efeitos biológicos podem ocorrer quando um radical livre reage com um composto não-radical formando outro radical livre, induzindo sucessivamente reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO) (MENECHINI,1987). Estas reações em cadeia apresenta basicamente 3 estágios: iniciação, propagação e terminação (BELLO-KLEIN, 1994). No primeiro, a EAO promove um ataque a uma molécula orgânica (ex.: ácidos graxos da cadeia lateral de lipídios), retirando um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Isto leva a formação de um radical centrado no carbono ($\cdot\text{CH}$), que tende a se estabilizar, por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado que, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio produz lipídios peróxidos (radical peroxil). No estágio seguinte, a propagação, os radicais peroxil podem retirar hidrogênio de outra molécula lipídica, originando novos radicais reativos, ou se combinar com átomos de hidrogênio, produzindo lipídios hidroperóxidos. Estes últimos sofrem a fase de terminação, na qual, pela presença de complexos com metais (Fe e Cu), sofrem uma decomposição, originando aldeídos (malondialdeído),

hidroperóxidos voláteis (pentano, etano) e outros produtos passíveis de serem identificados experimentalmente (OHKAWA et al., 1979; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al.,1990; COHEN, 1992; STEIN et al.,1993; MATHEWS et al.,1994; ORTOLANI et al.,1995). Nesta etapa de terminação , dois radicais peroxil poderiam reagir entre si formando tetróxido instável que se decompõem, originando oxigênio *singlet* e carbonilas excitadas. Estas espécies excitadas retornam ao estado fundamental, emitindo quantas de luz visível.

Este processo é conhecido como quimiluminescência e se constitui num importante método de quantificação da LPO (Figura 5) (COHEN,1992; BELLO-KLEIN, 1994; NUNES,1995).

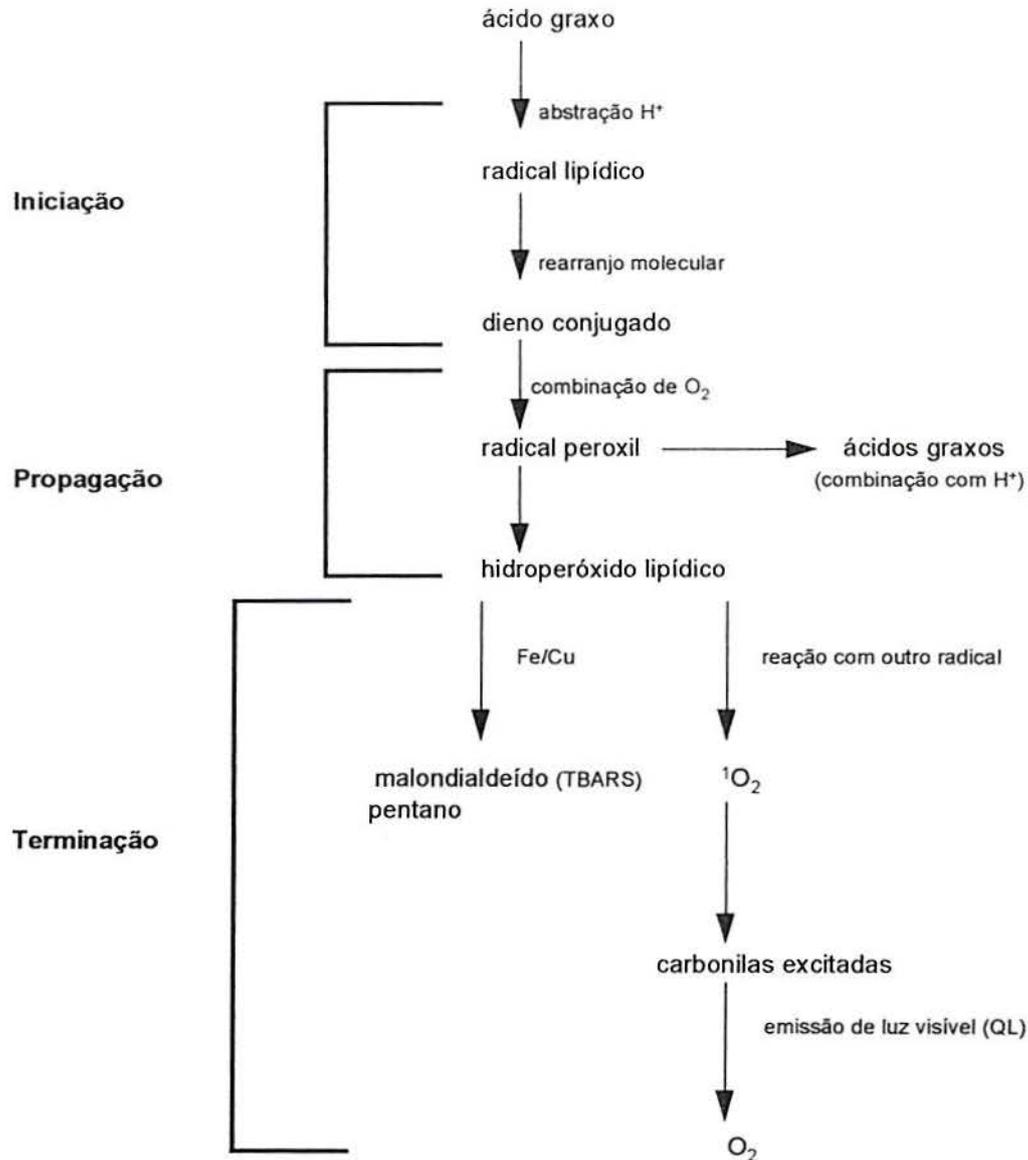


Figura 5: Etapas da lipoperoxidação de membranas celulares em cadeia: a) Iniciação: ataque a uma molécula orgânica (ácido graxo da membrana celular) por um radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$); b) Propagação: radical peroxil ou peróxi, formado a partir da combinação de um dieno conjugado, formado por um rearranjo molecular, com o oxigênio, possuindo propriedade de reiniciar o processo através do ataque a um ácido graxo adjacente, ou pode se combinar com o hidrogênio abstraído formando um lípido hidroperóxido; c) Terminação: os lípideos hidroperóxidos se decompõe através de reações catalisadas por metais (ferro e cobre) produzindo aldeídos como o malondialdeído (medido

laboratorialmente pelo método do TBARS) e outros hidrocarbonetos; além disso dois radicais peróxil reagem entre si formando um tetróxido instável que ao se decompor formam o oxigênio singlet e carbonilas excitadas que ao retornarem ao seu estado fundamental emitem quantas de luz visível (medido pelo método da quimiluminescência- QL)(Adaptado de: DEL MAESTRO, RF: An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492 p.153-68, 1980).

1.4 SÍTIOS DE AÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

As EAO formadas durante os processos metabólicos agem nos compartimentos extra e intracelular, assim como sobre as membranas das células dos organismos (BULKEY, 1983; ORTOLANI et al., 1995; ABROSIO et al., 1995). No espaço extracelular, as alterações estruturais e bioquímicas que estas espécies causam relacionam-se com o ataque aos glicosaminoglicanos, incluindo o ácido hialurônico, componente essencial do espaço intersticial e de líquidos especializados, como o vítreo e sinovial (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983). Este ataque pode se estabelecer através de um mecanismo de despolarização oxidativo-redutiva ou ser induzido através da geração de EAO pela via da xantina oxidase (DEL MAESTRO, 1980). A degradação dos componentes do meio intersticial, como o ácido hialurônico e colágeno altera significativamente a permeabilidade celular e as características estruturais dos tecidos vivos. Já no meio intracelular ocorre o mecanismo de LPO, que é um processo fisiológico e contínuo nas membranas celulares, sendo um fator de remoção celular e um passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e

leucotrienos, bem como na fagocitose, pinocitose e lise de membranas de importantes organelas intracelulares como as lisossomiais e mitocôndriais (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; MENEGHINI, 1987; CROSS et al., 1987). A ruptura de organelas lisossomiais com a conseqüente liberação de enzimas líticas pode potencializar o dano celular induzido pelo radical (BULKEY, 1983). As membranas celulares, por serem formadas, em grande parte, por lipídios insaturados e proteínas, são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo (BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; CROSS et al., 1987; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992). Este causa gradual perda de fluidez da membrana, aumento do potencial de membrana e aumento da permeabilidade iônica (por exemplo ao Ca^{++}). Se prolongada, pode ocasionar desintegração da membrana celular (HANSSON et al., 1982; PALLER et al., 1984). As enzimas ligadas a membrana celular, assim como os receptores de várias substâncias podem ser inativadas. Por exemplo, a ligação da serotonina aos seus receptores pode ser diminuída pela LPO (McCORD, 1983). Se a LPO atingir a membrana lisossomal, pode haver liberação de enzimas lisossômicas e fosfolipases Ca^{++} dependentes, as quais podem acelerar a degradação das membranas (PALLER et al., 1984; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; MARUBAYASHI et al., 1991; COHEN, 1992; MATHEWS et al., 1994; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Também os aldeídos produzidos na etapa de terminação podem ser citotóxicos (NAUTA et al., 1990).

1.5 SISTEMAS DE DEFESA CONTRA AS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

Na luta pela sobrevivência e adaptação a meios ricos em oxigênio, os seres aeróbicos desenvolveram uma série de mecanismos biológicos destinados ao controle e inativação das EAO geradas durante o metabolismo do oxigênio, podendo terem sido estes os fatores principais que nortearam a evolução e sobrevivência das espécies nesses meios (GERSCHMAN, 1981; HANSSON et al.,1982; BULKEY, 1983; McCORD,1983; MENEGHINI,1987; MATHEWS et al., 1994).

Se esta neutralização ocorrer na fase de iniciação ou propagação da LPO, havendo a formação de produtos menos tóxicos, a substância é chamada *scavenger* (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY,1983; BELLO-KLEIN,1994). A substância pode, também, absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os. Neste caso é chamado de *quencher*.(DEL MAESTRO, 1980; BELLO-KLEIN, 1994).

Os principais sistemas de defesa contra as EAO existentes nos seres aeróbicos podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos (DEL MAESTRO,1980; PALLER et al.,1984; MENEGHINI,1987; HANSSON et al., 1990; BELLO-KLEIN,1994; FRANSSEN et al.,1995). Dentre os sistemas



enzimáticos podemos destacar três: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (Gpx). (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI,1987; HANSSON et al.,1990; KARWINSKI et al.,1993; BELLÓ-KLEIN,1994; MATIELI, 1994).

A SOD é o maior sistema de defesa em células aeróbicas, combatendo os efeitos tóxicos do oxigênio (BULKEY, 1983; McCORD,1983; SOUTHARD et al.,1987; MENEGHINI,1987; GALAT et al.,1990; MATHEWS et al., 1994; DREWS et al.,1995; DI LISA et al.,1995; ORTOLANI et al.,1995; LEFEBVRE et al.,1995). Está amplamente distribuída, na forma que contém cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZn-SOD), presente no citosol das células eucarióticas ou na forma contendo manganês (Mn-SOD), localizada na matriz mitocondrial (McCORD & FRIDOVICH, 1969; DEL MAESTRO,1980; BULKEY,1983). Este complexo enzimático catalisa a dismutação do radical superóxido para formar peróxido de hidrogênio e oxigênio (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Esta reação ocorre espontaneamente em pH fisiológico, porém na presença da SOD sua velocidade é aumentada na ordem de 10^4 (BELLÓ-KLEIN,1994).



Figura 6 : Reação de dismutação: a superóxido dismutase é a enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como forma de detoxificação. (Adaptado de DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492 p.153-68, 1980).

A catalase é uma hemoproteína peroxidase específica para o H_2O_2 . Encontra-se amplamente distribuída em órgãos como o fígado, rins, cérebro e nos eritrócitos (BULKEY,1983; MENEGHINI,1987; MATIELI,1994; TAKAYAMA et al.,1994). A sua atividade no controle do H_2O_2 está representada abaixo:

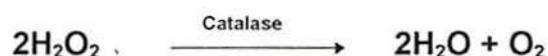


Figura 7: Reação da catalase: O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado pela dismutação do radical superóxido, é transformado em água e oxigênio molecular pela enzima catalase, detoxificando a EAO(Adaptado de DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492 p.153-68, 1980).

A glutationa peroxidase tem ação peroxidase inespecífica para o H_2O_2 , podendo ou não utilizar selênio como cofator(DEL MAESTRO,1980; MENEGHINI,1987; BELLÓ-KLEIN, 1994; MATIELI,1994). Possui intensa atividade no fígado e eritrócitos, e moderada no coração, rins e pulmões, e baixa nos músculos (NAMURA et al., 1995). Esta enzima é requerida para a reação de hidroperóxidos (ROOH) com glutaciona reduzida (GSH) originando glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, como demonstrado a seguir:



Figura 8 : Glutationa peroxidase: catalisa a reação de hidroperóxidos (H_2O_2) com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido.(Adaptado de DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol. 492 p.153-68, 1980).

A exposição de animais a concentrações aumentadas de O_2 freqüentemente aumenta a atividade da SOD, CAT e GPx em muitos tecidos, o que significa que a quantidade presente normalmente é suficiente somente para equilibrar taxas normais de produção das EAO, e assim preservar a integridade celular e por conseguinte dos órgãos (OREDSSON et al.,1995; DI LISA et al.,1995).

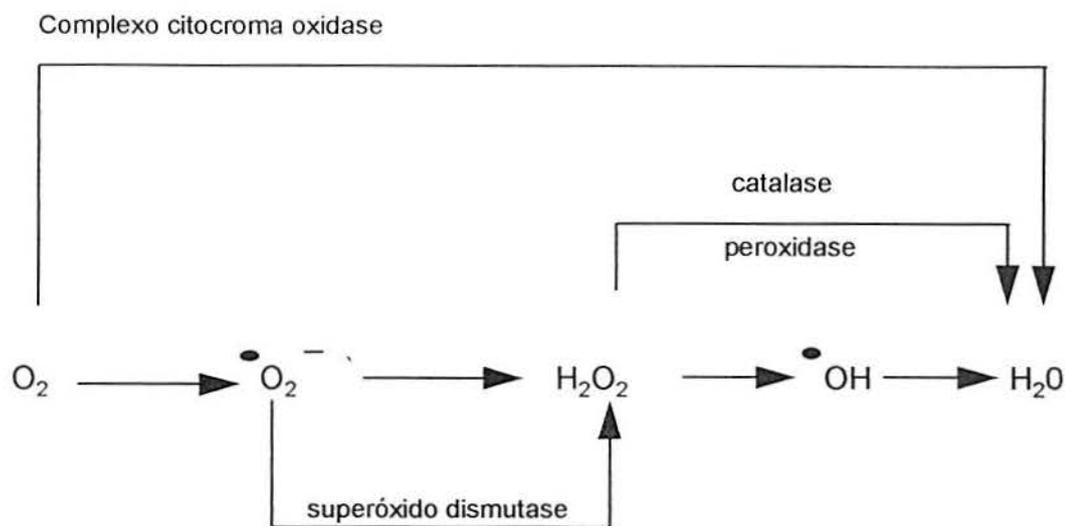


Figura 9 : Mecanismos endógenos de defesas enzimáticas para detoxificação de EAO geradas pela redução univalente do oxigênio molecular (O_2). O complexo citocroma oxidase é responsável pela detoxificação da maior parte do oxigênio reduzido tetravalentemente, prevenindo assim a liberação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxil ($\cdot OH$) para o meio intracelular. A redução univalente embora de menor proporção porém de importância significativa é detoxificada através da superóxido dismutase que catalisa a dismutação do radical $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) prevenindo o acúmulo de espécies radicais reativas. A Catalase e peroxidases catalisam a redução do peróxido de hidrogênio diretamente em água, sem a produção de intermediário tóxicos (Adaptado: DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol.492 p.153-68, 1980).

Entre os sistemas não-enzimáticos temos uma subdivisão em hidrofóbicos, hidrofílicos e estruturais. Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas compõem a região hidrofóbica das células. O alfa-tocoferol (vitamina E) e os beta-carotenos, presentes nas membranas celulares fornecem átomos de hidrogênio e podem prevenir reações de peroxidação

propagadas em cadeia nas mesmas, evitando a desestruturação da arquitetura celular (DEL MAESTRO, 1980; MENEHINI, 1987; MATIELI, 1994; FRANSSEN et al., 1995; DEFRAIGNE et al., 1995). Podem também se acoplar *quenchers* ao O₂ e, assim, prevenir a formação de hidroperóxidos lipídicos, mantendo a permeabilidade e estabilidade das membranas celulares (DEL MAESTRO, 1980; BELLÓ-KLEIN, 1994). Os carotenóides são compostos isoprenóides amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham um importante papel protetor das células e dos organismos (MENEHINI, 1987; BELLÓ-KLEIN, 1994; NUNES et al., 1995).

Por outro lado, os sistemas hidrofílicos são representados por substâncias químicas que agem impedindo as reações dos radicais livres que se processam em meios iônicos e aquosos dos compartimentos celulares. O ácido ascórbico, cisteína e glutathione reduzida, ceruplasmina, transferrina, triptofano e histidina são os principais representantes, agindo principalmente no controle do radical hidroxil (DEL MAESTRO, 1980; MENEHINI, 1987; MATIELI, 1994; BELLÓ-KLEIN, 1994). O colesterol, intercalado no interior das membranas, pelo seu tamanho e estrutura é o principal representante dos sistemas estruturais, podendo proteger os ácidos graxos da lesão peroxidativa. A localização de certos peroxissomos e mitocôndrias, com seus mecanismos especializados de *scavengers*, parecem ter papel importante no controle de reações causadas pelos radicais livres (DEL MAESTRO, 1980).

Portanto, antioxidantes endógenos protetores operam continuamente como mecanismo de defesa fisiológico contra as EAO que são gerados por

processos metabólicos que normalmente ocorrem para manter a integridade celular e também quando solicitados em situações de estresse como, por exemplo, na isquemia e reperfusão (Figura 10) (HIRASAWA et al.,1978; MENEGHINI,1987; CROSS et al.,1987; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al.,1990; GREENE & PALLER, 1992; BELLÓ-KLEIN,1994; NUNES et al.,1995; ORTOLANI et al.,1995).

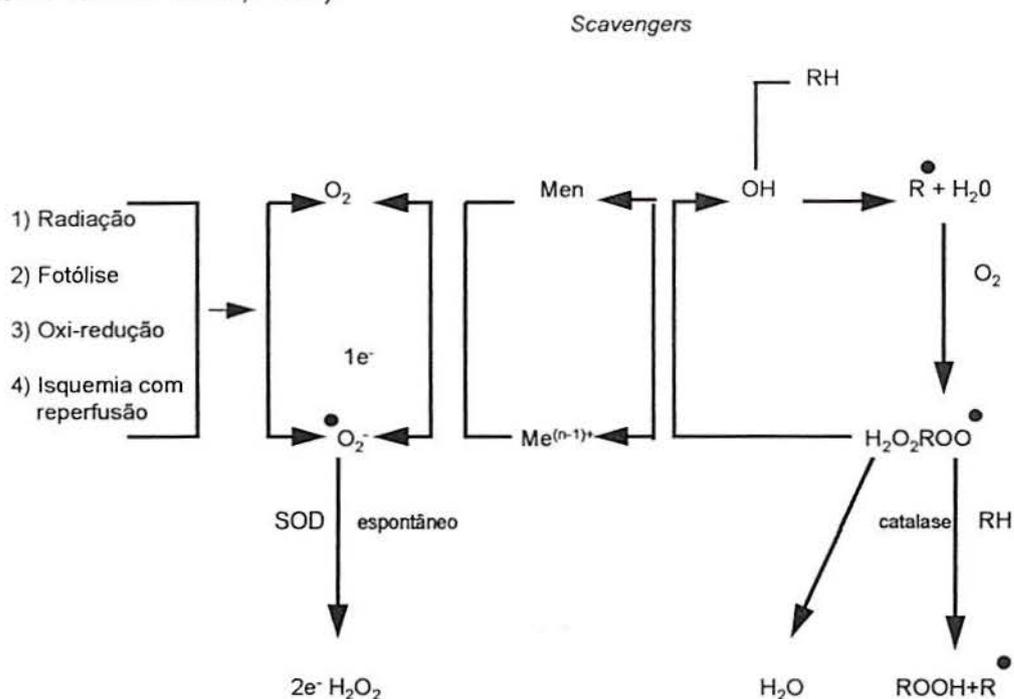


Figura 10 : Produção e reatividade de espécies ativas do oxigênio no meio intracelular. Várias situações como radiação, fotólise, metabolismo oxidativo, isquemia e reperfusão possuem potencial de produção de radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), ou seja, um oxigênio molecular com um elétron desemparelhado em sua camada mais externa. Em uma contínua reação em cadeia, que é típico de radicais livres intracelulares, metais (Me^{n+}) podem ser reduzidos pelo ânion superóxido ($Me^{(n-1)+}$) que reagem com o peróxido de hidrogênio para formar o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Este por sua vez pode então causar dano tecidual como por exemplo através da degradação do ácido hialurônico. Entretanto, em vários pontos nesta seqüência de reações, agem substâncias detoxificadoras destas espécies tóxicas como mecanismo de defesa celular, destacando-se a superóxido dismutase(SOD), catalase e outras substâncias com potencial de "scavengers". (DEL MAESTRO RF- An approach to free radicals in medicine and biology. Free radicals in medicine and biology, vol.492 p.153-68, 1980).

1.6 A isquemia reperfusão como fonte de Espécies Ativas do Oxigênio(EAO)

Na Medicina, onde o processo isquêmico é claramente definido como deletério , a idéia de que o oxigênio seja um elemento potencialmente tóxico parece ser uma grande controvérsia, já que diferentes mecanismos podem tomar parte do dano celular durante a isquemia e reperfusão sangüínea (SOUTHARD et al.,1987; HASSELGREN,1987; CROSS et al.,1987; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; MATIELI, 1994; RHODEN et al.,1997). Entretanto, este potencial passa a ser foco de discussão quando os papéis das EAO foram definidos, principalmente na última década (MATHEWS et al., 1994; NUNES,1995).

A isquemia e reperfusão de órgãos tem sido amplamente reconhecida como fonte importante das EAO com conseqüências deletérias sobre estes órgãos (HANSSON et al.,1982; BULKEY,1983; PALLER et al., 1984; McCORD,1985; SOUTHARD et al.,1987; PUNCH et al.,1992; NILSSON et al.,1993). Na realidade, a isquemia é referida, em certas circunstâncias, como menos lesiva aos tecidos do que o grande aporte de oxigênio que ocorre após restabelecida a circulação arterial, o que leva a formação das EAO e suas conseqüências (McCORD,1985; MENEGHINI,1987; HASSELGREN,1987; MATIELI,1994; NUNES,1995). Após um período de isquemia , a formação das EAO cresce dentro de minutos da reperfusão quando atingem um pico e, a

seguir, declina lentamente para uma linha de base (NUNES,1995). As EAO danificam as membranas celulares através da peroxidação de ácidos graxos no interior da estrutura dos fosfolípidos, elementos fundamentais da arquitetura das membranas celulares (HANSSON et al.,1982; BULKEY,1983; PALLER et al.,1984; NAUTA et al.,1990; COHEN,1992; MATHEWS et al.,1994). Durante este processo radicais peróxido dos lipídeos, hidroperóxido de lipídeo e outros produtos da fragmentação dos mesmos são agentes oxidativos ativos (BULKEY,1983; PUNCH et al.,1992; MATHEWS et al., 1994). Assim, a reatividade do radical livre tem uma tendência para gerar uma reação em cascata para produzir espécies radicais ativas que termina com efeitos destrutivos sobre a célula (DEL MAESTRO,1980; BULKEY,1983; HASSELGREN, 1987; PUNCH et al.,1992).

Os mecanismos propostos como responsáveis pela geração das EAO, sob estas circunstâncias, incluem a lesão mitocondrial, a atividade da xantina oxidase, a via do ácido araquidônico, óxido nítrico ou o acúmulo de polimorfonucleares teciduais e, especificamente, ao nível do fígado as células de Kupffer tem sido referidas como fonte de grande atividade geradora destas espécies radicais (PARKS et al.,1983; CROSS et al.,1987; SOUTHARD et al.,1987; GALAT et al.,1990; BROWSE et al.,1994; MATHEWS et al., 1994; MENGER,1995; KOBAYASHI et al.,1995; GRISHAM, 1995;; ALEXANDER,

1996; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996). Diminuindo o aporte de oxigênio para níveis críticos ao ambiente aeróbico, ocorre, por parte das células, uma tentativa de adaptação para uma situação de metabolismo anaeróbico em que as reservas de glicose, glicogênio e energia sob forma de ATP tomam parte importante na habilidade celular para superar esta situação de estresse e a atividade mitocondrial diminui significativamente. No período de reperfusão, as células expostas a grandes tensões de oxigênio precisam de um rápido reajuste de seu metabolismo para uma situação de metabolismo aeróbico. Estas concentrações altas de oxigênio em uma situação de funcionamento inadequado das mitocôndrias (lesadas durante o período isquêmico) junto com a diminuição dos agentes de detoxificação das EAO resultam na geração de quantidades muito altas das mesmas, culminando com uma futura lesão das membranas e morte celular (CROSS et al., 1987; NAUTA et al., 1990; COHEN, 1992; MATHEWS et al., 1994; NUNES, 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996).

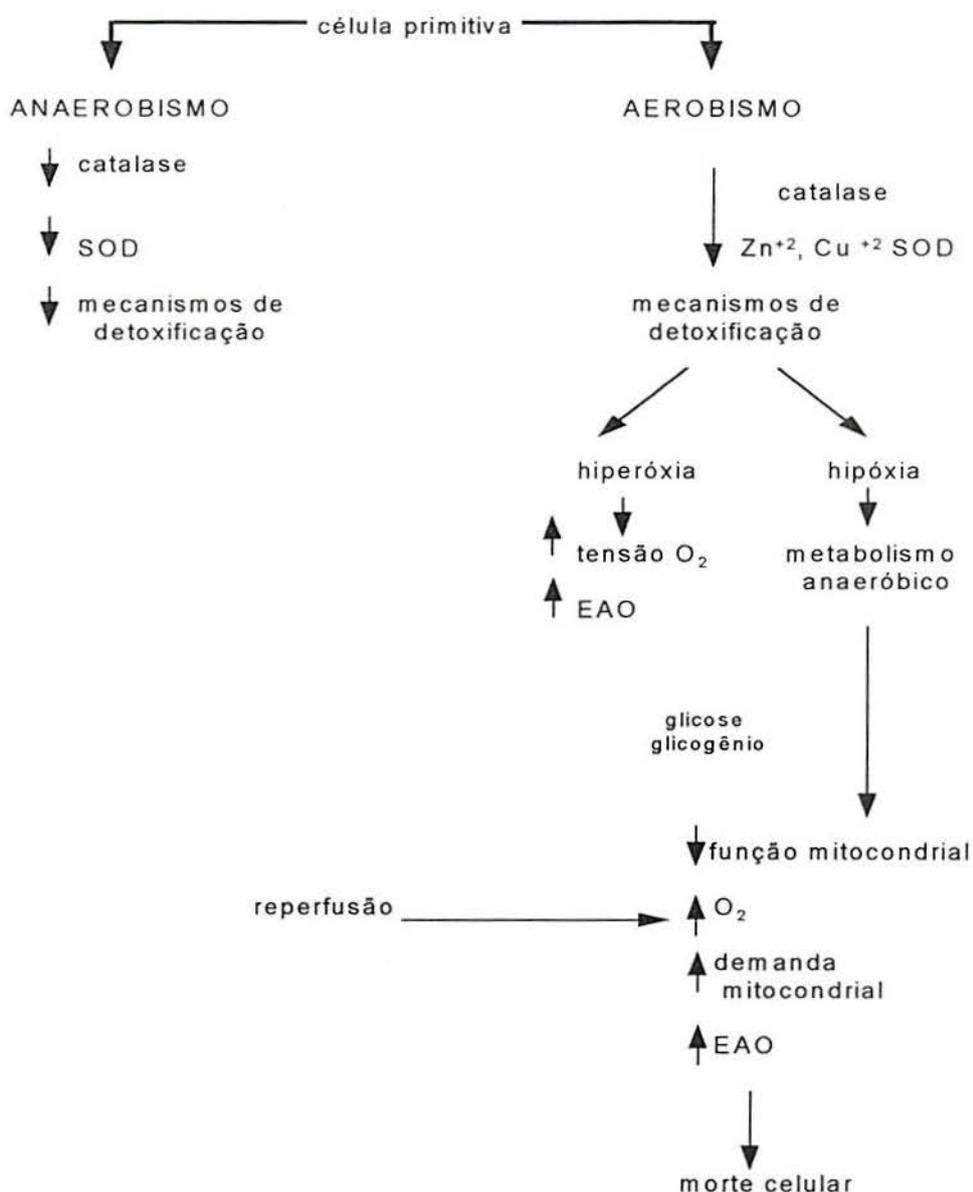


Figura 11 : Esquema geral de formação de Espécies Radicais Reativas do oxigênio em situações de isquemia e reperfusão. EAO:Espécies ativas do oxigênio; O₂:oxigênio molecular;SOD:superóxido dismutase; Zn⁺ e Cu⁺ :íons metais de zinco e cobre. (Adaptado: DEL MAESTRO, RF- An approach to free radicals in medicin and biology. Free radicals in medicine and biology, 492: 153-168, 1980).

Provas inequívocas de que este fenômeno se processa em tais situações são os diversos experimentos já efetuados que demonstram uma concentração extremamente reduzida de malondialdeído, produto da peroxidação dos ácidos graxos, em homogeneizados de tecidos de órgãos submetidos a isquemia e não reperfundidos e uma concentração progressivamente maior associada a reperfusão e o reflexo desta oxidação ao nível da função do órgão em questão, assim como o fato de substâncias sabidamente detoxificadoras de EAO possuírem a capacidade de reduzir este processo (PALLER et al., 1984; NORDSTRÖM et al., 1985; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; RINALDI et al., 1995).

1.6.1 Via da Xantina Oxidase

O mecanismo da xantina oxidase é o mais plenamente estabelecido como gerador de EAO na assim chamada síndrome isquêmico reperfusional (PARKS et al., 1983; SOUTHARD et al., 1987; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; GREENE & PALLER, 1992; KARWINSKI et al., 1993; IMAMURA et al., 1995; RHODEN et al., 1997). Inicialmente proposto e descrito por GRANGER et al., 1981, tem recebido muitos adeptos. Entretanto, outros não tem conseguido reproduzir os mesmos resultados, questionando os seus mecanismos. De acordo com esta hipótese, a forma nativa da enzima xantina oxidase (tipo O) é a enzima xantina deidrogenase (tipo D), enzima que utiliza a nicotinamida adenina (NAD) como acceptor de elétrons, e portanto, não possui capacidade de gerar EAO (McCORD, 1985; McCORD, 1985; NAUTA et al., 1990). Em tecidos normais, 90% da atividade desta enzima existe sob a

forma do tipo D (McCORD,1985; CROSS et al.,1987). Nas situações de isquemia , hipóxia ou qualquer estado de baixo nível energético a forma tipo D é convertida na forma tipo O, enzima que utiliza o oxigênio como acceptor de elétrons e, portanto, capaz de gerar ânions superóxidos, decorrente de uma oxidação sulfidrilica ou proteólise limitada (McCORD, 1985; SOUTHARD et al., 1987; CROSS et al.,1987; NAUTA et al.,1990; PUNCH,1992; FREDERIKS et al.,1995). Igualmente, nestas situações, ocorre um decréscimo do conteúdo de ATP, resultado do baixo nível energético ou do consumo de seus substratos em uma situação de anaerobiose (SOUTHARD et al.,1987; ZAGER & GMUR,1989; GREENE & PALLER,1992; GÜRKE,1995; XIA et al.,1996). O ATP, na tentativa de manter a atividade energética da célula, é catabolizado em adenosina difosfatada (ADP) , adenosina monofosfatada (AMP), inosina e, finalmente, em hipoxantina, que compõe substrato para a ação da xantina deidrogenase-oxidase (CUNNINGHAM et al.,1974; PARKS et al., 1983; PALLER et al., 1984; ZAGER & GMUR, 1989; MARUBAYASHI et al.,1991; GREENE & PALLER,1992; COHEN, 1992; KARWINSKI et al.,1993; GÜRKE et al.,1995; LEFEBVRE et al.,1995; DI LISA et al.,1995; WILLET et al.,1995; BACH et al.,1996). Além disso, com níveis energéticos extremamente baixos a célula é incapaz de manter os gradientes iônicos, elevando, por conseguinte, o cálcio citosólico (McCORD, 1985; HANSSON et al., 1990; DI LISA et al.,1995; CHAVEZ-CARTAYA et al.,1996; BACH et al., 1996). Concentrações citoplasmáticas elevadas de cálcio podem ser um dos fatores que disparam uma série de eventos bioquímicos, entre os quais destaca-se a ativação de proteases cálcio-dependentes, que, atuando sobre a xantina deidrogenase, convertem-na em sua forma oxidase (Tipo O) (McCORD,1985; CROSS et al.,

1987; HANSSON et al.,1990; STEIN et al.,1993; ABROSIO et al., 1995; FREDERIKS et al.,1995; LEE & KIM, 1995; KON et al.,1997). Entretanto, nesta fase a xantina oxidase ainda não é capaz de produzir as EAO. Durante o período isquêmico já pode ter ocorrido dano tecidual em função das alterações iônicas do cálcio e da proteólise (lesão isquêmica) (ABROSIO et al.,1995). Entretanto, após restabelecida a reperfusão sangüínea arterial e, por conseguinte, ocorrendo um grande afluxo de oxigênio aos tecidos, a oxidação da hipoxantina e xantina é processada e altas proporções de EAO são formadas paralelamente, ultrapassando a capacidade de detoxificação pelos mecanismos endógenos descritos anteriormente (CUNNINGHAM et al.,1974; HANSSON et al.,1982; PARKS et al., 1983; PALLER et al.,1984; McCORD, 1985; HASSELGREN, 1987; SOUTHARD et al., 1987; HANSSON et al.,1990; PUNCH et al.,1992; FRANSSEN et al.,1995; LEE & KIM, 1995). O mecanismo de formação das EAO neste processo é explicado pelo fato da enzima xantina oxidase utilizar o oxigênio molecular(O_2) como um acceptor de elétrons, formando assim o radical superóxido ($\cdot O_2^-$) (PUNCH et al.,1992; KARWINSKI et al.,1993). Além disso, no período reperfusional as células não podem reutilizar a xantina e o ácido úrico para ressíntese do ATP, uma vez que a catálise da hipoxantina em xantina e uratos é irreversível (CUNNINGHAM et al.,1974; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al. 1990; GREENE & PALLER, 1992).

O radical superóxido ($\cdot O_2^-$) assim formado segue rotas metabólicas destinadas a formação de outros radicais. Na realidade, a maior toxicidade do radical superóxido provém dos produtos de sua transformação, ou seja, de sua metabolização em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BULKEY, 1983). O peróxido

assim formado pode ser detoxificado pela catalase, formando água. Entretanto, quando em contato com o ferro (Fe^{+2}) e O_2^- , pode reagir formando o radical OH^\cdot , extremamente reativo, que associado aos anteriores pode agir sobre os ácidos graxos dos fosfolípidos das membranas celulares determinando a lipoperoxidação (BULKEY,1983; CROSS et al.,1987; LEE & KIM,1995). Por outro lado, o radical hidroxil pode também levar a ativação oxidativo dependente das fosfolipases da membrana celular e, por conseguinte, a liberação, a partir dos fosfolípidos, de intermediários pró-inflamatórios, ou seja, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (PAF) mediado ou não pela via do óxido nítrico (BULKEY, 1983; GRISHAM, 1995; LOPEZ-NEBLINA et al.,1996; SHITO et al., 1997).

ISQUEMIA

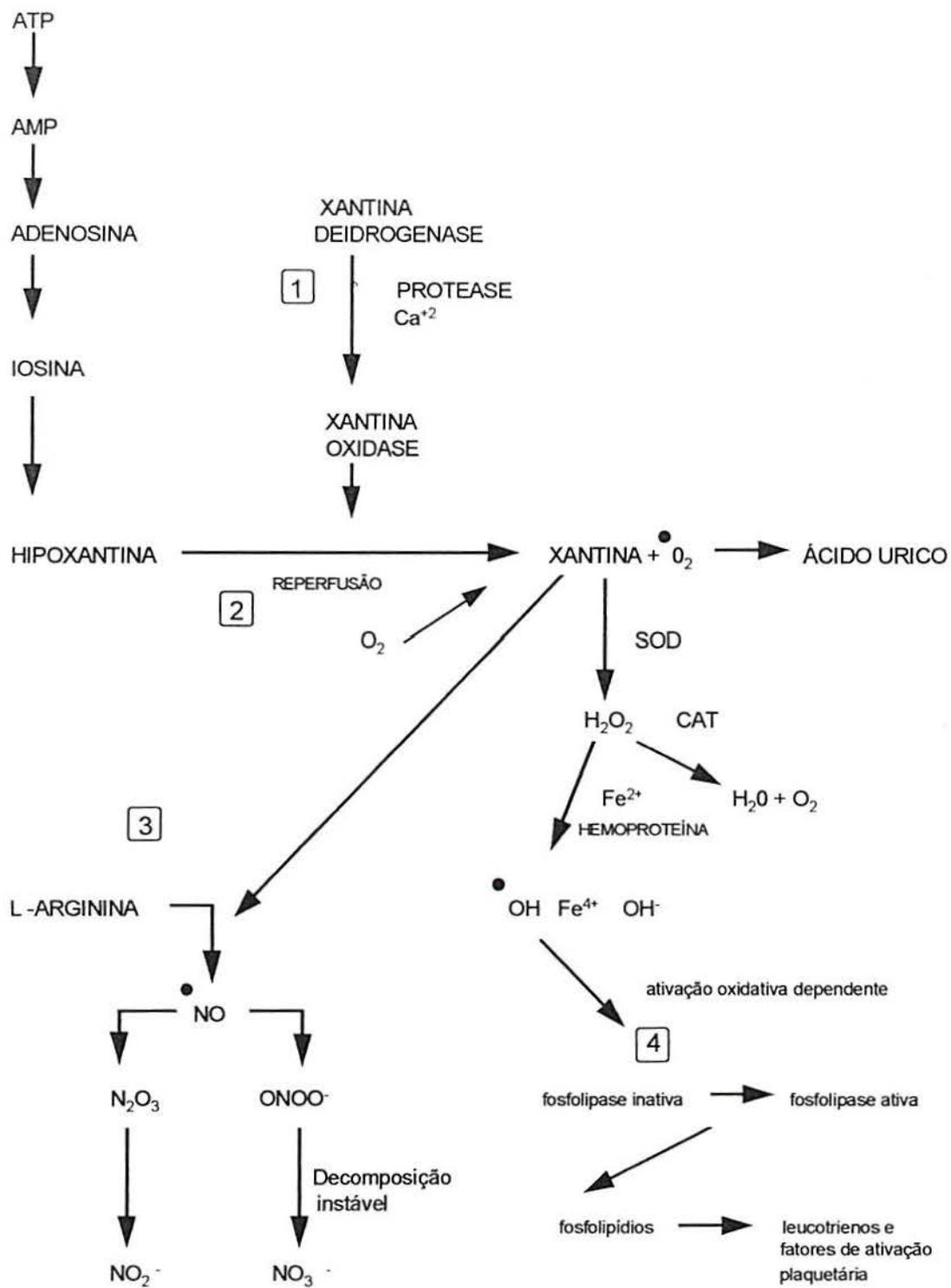


Figura 12 : Principais rotas metabólicas envolvidas na geração de Espécies Ativas do Oxigênio pela isquemia e reperfusão. Durante a isquemia produtos de Adenosina Trifosfatada (ATP) são degradados até a hipoxantina, substrato para a ação da enzima xantina oxidase tipo O(formada a partir da dehidroxantina oxidase tipo D por uma proteólise limitada em presença de cálcio) levando a formação de uratos e radicais superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (Via da Xantina oxidase). O radical superóxido sob a ação da superóxido dismutase é convertido em peróxido de hidrogênio(H_2O_2) (reação de dismutação) e, este por sua vez sob a ação da catalase é transformado em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). Entretanto, o H_2O_2 em presença de metais de transição (ferro, hemoproteínas) pode dar origem ao potente radical hidroxil (Reação de Fenton) , com grande atividade reativa , diretamente sobre moléculas de ácidos graxos das membranas celulares ou através da ativação oxidativa da fosfolipase originando mediadores inflamatórios(leucotrienos e fatores de ativação plaquetária, entre outros) (Via do Ácido Araquidônico). O óxido nítrico, formado a partir da l-arginina pela óxido nítrico sintase, ao nível do endotélio microvascular, age como detoxificador do radical superóxido formando nitrato(NO_3^-), a partir da decomposição de peroxinitrito(ONOO^-), produto de formação transitória ou através da formação de óxido nitroso (N_2O_3), em presença de oxigênio e água do meio (Via do Óxido Nítrico). 1- inibidores da tripsina ; 2- Inibidores de xantina oxidase; 3- Óxido nítrico sintas e ou produtos que estimulassem a formação de óxido nítrico; 4- Inibidores da lipo e ciclo-oxigenase consistem em formas racionais de interferir nestas rotas.(GRISHAM, 1995; NUNES,1995; NAUTA et al.,1990; DEL MAESTRO, 1980;CROSS et al.,1987; GRUNFELD et al., 1995)

1.6.2 Via do óxido nítrico e do ácido araquidônico.

A inter-relação das EAO com a via do óxido nítrico levando à formação do potente radical hidroxil pode ser compreendida pela seqüência de eventos que se estabelecem em cadeia (GRISHAM, 1995)(Figura 12). O óxido nítrico teria como ação uma atividade modulatória (*downregulation*) da interação entre leucócitos e células endoteliais, causando vasodilatação, além diminuir a migração e agregação leucocitária (neutrófilos) e plaquetária (BULKEY,1983; PUNCH et al.,1992; BROWSE et al.,1994; GRUNFELD et al., 1995;

KOBAYASHI et al.,1995; ALEXANDER, 1996; IMAMURA et al.,1995; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; SHITO et al., 1997). Apresentando um elétron desemparelhado, o óxido nítrico pode agir como acceptor do elétron do radical superóxido e, assim, detoxificar este radical (KOBAYASHI et al., 1995). Sob condições normais, quando a geração orgânica de óxido nítrico (NO) excede a produção de $\cdot O_2^-$, a reação do $\cdot NO$ com o radical livre é extremamente rápida, formando peroxinitrito ($ONOO^-$). Uma conjugação ácida deste forma o ácido peroxinitroso ($NOOH$). Entretanto, este ácido apresenta uma estabilidade muito lábil, sendo rapidamente decomposto para formar nitrato (NO_3^-) (GRISHAM,1995). O óxido nítrico junto com o oxigênio molecular do meio forma o óxido nitroso (N_2O_3) o qual pode reagir com a água para formar peróxido nítrico (NO_2^-). Este, por sua vez, sofre transformação em NO_3^- . A decomposição do NO_3^- libera o radical $NO_2\cdot$ e reage com o H^+ do meio para formar o radical $\cdot OH$ (NAUTA et al.,1990; NUNES et al.,1995; GRUNFELD et al., 1995; GRISHAM,1995).

Se, contudo, a relação $\cdot O_2^-/NO$ aumenta, isto é, por superprodução de superóxido ou por diminuição da produção de NO (inibidores da óxido nítrico sintase - L-NAME - N^G - nitro-L-arginina metil éster), o $\cdot O_2^-$ é espontânea ou enzimaticamente deslocado para a reação de dismutação, com conseqüente formação de H_2O_2 (GRISHAM,1995). A produção excessiva de $\cdot O_2^-$ e de H_2O_2 , em presença da atividade redox ativa, tal como ferro, promoverá a formação de $\cdot OH$ (Reação de Fenton), com conseqüente ativação oxidante-dependente da via do ácido araquidônico e a subsequente liberação de fosfolipase A_2 e formação de mediadores pró-inflamatórios, como leucotrienos (LBT_4) e fatores

de ativação plaquetária (PAF), aumentando a migração de polimorfonucleares nas vênulas pós-capilares e o efluxo de proteínas na microvasculatura (PUNCH et al., 1992; TAKAYAMA et al., 1994; GRISHAM, 1995; GRUNFELD et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; SHITO et al., 1997).

O uso de substâncias quelantes de ferro, como a desferoxamina, de inibidores da óxido nítrico sintase de diversos antiinflamatórios (corticóides, diclofenaco de sódio) e de substâncias detoxificadoras das espécies radicais, interferindo em etapas específicas destas rotas inter-relacionadas, efetuadas em diversos experimentos, comprovam os mecanismos envolvidos na geração, destino e ações das EAO formadas (TAKAYAMA et al., 1994; GRISHAM, 1995; CONNOLLY et al., 1995; GRUNFELD et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995)(Figura 12). Além disso, substâncias como o nitroprussiato de sódio, através da sua ação modulatória sobre o óxido nítrico, foram capazes de reduzir significativamente o efluxo leucocitário a partir do endotélio capilar em situações de isquemia e reperfusão renal em ratos, melhorando os parâmetros funcionais do rim, reforçando o envolvimento destas rotas no fenômeno isquêmico reperfusional (LOPEZ-NEBLINA et al., 1996).

1.7 EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLÓGICAS NO CONTROLE E EFEITOS DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

Estudos experimentais diversos têm sido efetuados no sentido de respaldar a teoria da xantina oxidase na geração das EAO. O primeiro destes,

efetuado em intestino de ratos, mostrou que a administração de SOD (*scavenger* de EAO) preveniu o aumento da permeabilidade capilar de ratos submetidos a uma isquemia parcial da artéria mesentérica por um período de 30 minutos (CROSS et al.,1987). Outras drogas, como alopurinol, inibidor da xantina oxidase, também testado em modelos de isquemia similares, mostraram efeito protetor superior aos grupos não-tratados (ZAGER & GMUR,1989; GREENE & PALLER,1992; COHEN, 1992; KARWINSKI et al.,1993). Estudos em diferentes órgãos como fígado, coração, rins , músculo esquelético, pâncreas e pele de ratos têm evidenciado as mesmas características gerais envolvidas no mecanismo de geração de EAO mediadas pela via da xantina oxidase (HIRASAWA et al.,1978; PARKS et al.,1983; NORDSTRÖM et al., 1985; MARUBAYASHI et al., 1986; NAUTA et al.,1990; MARUBAYASHI et al.,1991; COHEN, 1992; FOSCHI et al.,1993; KARWINSKI et al., 1993; MATHEWS et al.,1994; RINALDI et al.,1995; OREDSSON et al.,1995; DREWS et al.,1995; FREDERIKS et al., 1995). Estes aspectos podem ser claramente observados no trabalho desenvolvido por CUNNINGHAM et al.,1974, no qual a queda na concentração tissular de ATP , ADP e AMP estava diretamente relacionado com o tempo de isquemia renal induzida em ratos, avaliado através de reações enzimáticas que dependem de energia para se processar, quando homogeneizados de tecidos renais eram expostos a determinadas substâncias.

Aspecto de grande relevância observado neste experimento (CUNNINGHAM et al.,1974) é o fato de que em animais pré-tratados com uma substância inibidora da xantina oxidase, o alopurinol, as concentrações teciduais das adeninas fosfatadas foram maiores e as reações, que

necessitavam de energia para ocorrer, se o fizeram de uma maneira mais completa e rápida.

Estudos com órgãos isolados como o coração, freqüentemente envolvido em processos de isquemia e reperfusão, mostraram a liberação da enzima creatinofosfoquinase, quando este era perfundido com substâncias oxigenadas, o mesmo não ocorrendo, ou ocorrendo em menores proporções, quando substâncias não oxigenadas eram perfundidas ou quando eram utilizadas substâncias de detoxificação de EAO (SOD, CAT) ou inibidores da xantina oxidase (CUNNINGHAM et al.,1974; HANSSON et al., 1982; McCORD,1985; CROSS et al.,1987).

Um grande número de substâncias farmacológicas, baseadas nos mecanismos hipotéticos de formação das EAO, tem sido utilizada com o intuito de reduzir a formação das mesmas EAO e, conseqüentemente, reduzir a injúria celular decorrente da isquemia e reperfusão (HIRASAWA et al.,1978; MARUBAYASHI et al.,1986; HASSELGREN, 1987; MARUBAYASHI et al.,1991; COHEN, 1992). Entre estas citam-se a coenzima Q₁₀, alopurinol, alfa-tocoferol, e glutathione que agiram especificamente sobre a formação das EAO (CUNNINGHAM 1974; DEL MAESTRO, 1980; HANSSON et al., 1982; McCORD, 1985; MARUBAYASHI et al.,1986; COHEN, 1992; DEFRAIGNE et al.,1995). Substâncias como a N-Acetilcisteína agindo no sentido de promover o aumento do glutathione intracelular, têm sido referidas também como possuidoras de um potencial benéfico (ORTOLANI et al.,1995). Outras, como o glucagon, dopamina, hidralazina, cloridrato magnesiano de adenosina

trifosfatada (ATP-MgCl₂), prostaglandinas E₁, atuam melhorando o fluxo sanguíneo ao órgão e evitando o fenômeno de vasoespasmos pós-isquêmicos (HIRASAWA et al., 1978; HASSELGREN, 1987). Substâncias como corticosteróides e anti-inflamatórios não esteróides agem estabilizando a membrana celular e de elementos subcelulares (HASSELGREN, 1987; TAKAYAMA et al., 1994; ODEFRAIGNE et al., 1995; DESCOTES et al., 1995). O nitroprussiato de sódio agindo pela mediação do óxido nítrico, diminuiria a interação leucocitária com a superfície endotelial, reduzindo assim, o efluxo celular inflamatório (KOBAYASHI et al., 1995; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996). A heparina, em função de sua ação anticoagulante, e assim evitando a deposição de fibrina, e através de mecanismos ainda não bem definidos, também tem sido proposta com possuindo ação protetora contra as EAO formadas na isquemia e reperfusão (NILSSON et al., 1993). Os bloqueadores dos canais de cálcio (lidoflazina, verapamil) e drogas como a clorpromazina que interferem no influxo de cálcio durante o processo isquêmico, também têm sido propostos como elementos capazes de exercer algum grau de proteção de órgãos e tecidos contra as EAO (HANSSON et al., 1990; STEIN et al., 1993; LEFEBVRE et al., 1995; DREWS et al., 1995; FREDERIKS et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Mais recentemente, a ciclosporina, agindo especificamente ao nível dos poros mitocondriais, evitando o acúmulo de cálcio no interior destas organelas e conseqüentemente mantendo a sua homeostase, foi postulada como tendo efeito protetor em situações de isquemia e reperfusão, haja visto serem as mitocôndrias o principal sítio energético das células (NICOLLI et al., 1995; WILLET et al., 1995).

1.8 EFEITOS DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO NA INJÚRIA HEPÁTICA

A despeito de medidas intensivas normalmente utilizadas quando da necessidade transitória da isquemia hepática, assim como de outros órgãos, uma substancial porcentagem de casos apresentam uma imediata lesão decorrente desta. Em nível hepático a necrose hepatocitária, entidade clínica mais comum após esta forma de injúria, embora reversível, pode levar à séria insuficiência deste órgão (CHEUNG et al.,1986).

Nas últimas décadas, muitos potenciais fatores de injúria celular, tais como a depleção de ATP, degradação fosfolipídica da membrana plasmática, ativação de sistemas autolíticos, acidose celular, lesão da membrana induzida por superóxidos, disfunção mitocondrial, têm sido referidos como tendo um papel central na injúria isquêmica e reperfusional (CHEUNG et al.,1986; CROSS et al.,1987; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; WILLET et al.,1995; CHAVEZ-CARTAYA et al.,1996).

A síndrome isquêmica e reperfusional é, certamente, multifatorial e o envolvimento das EAO derivados do metabolismo anormal do oxigênio é um dos prováveis fatores determinantes da patogênese da injúria dela decorrente (PARKS et al., 1983; CROSS et al.,1987; DEFRAIGNE et al.,1995; DESCOTES et al.,1995; MENGER et al.,1995; CHAVEZ-CARTAYA et al.,1996). Estudos distintos respaldam o mecanismo das EAO evidenciando efeitos benéficos de anti-oxidantes e, por outro lado, exacerbação do dano na deficiência destes,

assim como o fato da lipoperoxidação ser evento bem caracterizado nesta síndrome (GREENE & PALLER, 1992; MATHEWS et al., 1994).

Um decréscimo do nível de energia celular leva a um balanço anormal dos metabólitos intracelulares e a uma disfunção da membrana celular (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). A bomba de cálcio exibe uma considerável alteração em sua função, levando a um aumento do cálcio citosólico com exacerbação de todas as atividades metabólicas cálcio-dependentes, como a ativação de sistemas enzimáticas como, por exemplo, o das fosfolipases com o conseqüente dano produzido pela degradação fosfolipídica e alteração da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Além da perda da capacidade de síntese celular, células endoteliais são ativadas induzindo a alterações na microcirculação, com o envolvimento de leucócitos (células de Kupffer no fígado) e ativação do sistema de complemento no dano isquêmico (PALLER et al., 1984; SOUTHARD et al., 1987; MATHEWS et al., 1994; MENGER, 1995; WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Estes aspectos têm sido confirmados em alguns trabalhos experimentais envolvendo o uso de substâncias farmacológicas cuja ação reside no bloqueio dos canais de cálcio (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

Estes aspectos podem, por exemplo, justificar o fato da resistência ao fluxo sanguíneo hepático ter sido significativamente inferior em animais submetidos a isquemia e reperfusão, tratados previamente com a superóxido

dismutase, substância detoxificadora de EAO, quando comparados com grupos de animais controle (PALLER et al., 1984).

Recentemente, CONNOLLY et al., 1995, demonstraram claramente o envolvimento de fatores humorais (via do ácido araquidônico) na injúria isquêmico/reperfusional, onde a concentração de mediadores inflamatórios como Tromboxane B₂, leucotrienos, citocinas e fatores de ativação plaquetária são dependentes fundamentalmente da reperfusão. Além disso, este fenômeno pode estar relacionado com um incremento da injúria decorrente da isquemia e reperfusão e, em órgãos transplantados, isto poderia ser uma causa de incremento da imunogenicidade do enxerto (CONNOLLY et al., 1995). Estudos de LOPEZ-NEBLINA et al., 1996, por sua vez demonstraram importante participação do óxido nítrico, modulador da resposta e migração leucocitária, no dano celular e com reflexos sobre a função do órgão em situações de isquemia e reperfusão, bem como medidas capazes de reduzir este dano através da manipulação exógena da ação do óxido nítrico.

Entretanto, no que se refere a ação geradora de EAO pela enzima xantina oxidase, os resultados de diversos estudos experimentais tem sido controversos: trabalhos mostram efeitos benéficos de substâncias inibidoras da xantina oxidase sobre a função hepática e lipoperoxidação enquanto outros não demonstraram resultados significativos (ZAGER & GMUR 1989; GALAT et al., 1990; GREENE & PALLER, 1992).

O interesse neste é de vital importância para compreensão do fenômeno em tela, tendo em vista a origem das EAO e as rotas metabólicas distintas que levam a formação de outras espécies radicais e não, simplesmente, o efeito das mesmas, permitindo desta forma o uso de medidas exógenas com a intenção de interferir neste processo.

1.9 O ALOPURINOL COMO AGENTE PROTETOR CONTRA A AÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

O alopurinol, introduzido por Hitchings, Ellion e associados foi sintetizado originalmente com o intuito de ser uma droga antineoplásica (ELION, 1978; INSEL, 1996). Entretanto, descobriu-se que esta substância não possuía atividade antineoplásica, e testes *in vitro*, comprovaram que, na realidade, era um substrato e inibidor competitivo das enzimas xantina oxidase e dehidrogenase (ELION, 1978; KARWINSKI et al., 1993; INSEL, 1996). A inibição desta enzima "*in vivo*" foi inicialmente estabelecida em pacientes leucêmicos tratados com o antimetabólito 6-mercaptopurina. O alopurinol retardou a inativação da 6-mercaptopurina pela xantina oxidase, reduzindo a concentração plasmática e excreção renal de ácido úrico. O ensaio clínico posterior para tratamento da gota conduzido por RUNDLES (1970) obteve êxito, sendo rapidamente confirmado e, a partir de então, largamente utilizado para o tratamento da hiperuricemia primária da gota e da secundária aos distúrbios hematológicos ou terapia antineoplásica. O alopurinol e seu metabólito principal, a aloxantina, são inibidores competitivos e não-

competitivos, respectivamente, da enzima xantina oxidase, sendo esta inibição o seu principal efeito farmacológico (ELION 1978; HANSSON et al.,1982; ZAGER & GMUR, 1989). A aloxantina possui uma permanência longa nos tecidos e é, indubitavelmente, responsável pela maior parte da atividade farmacológica da droga (ZAGER & GMUR, 1989; INSEL,1996). A absorção desta droga ocorre de modo relativamente rápido após a administração oral, atingindo-se o pico de concentração plasmática em 30 a 60 minutos. Em torno de 20% da droga não são absorvidos, sendo eliminados nas fezes em 48 a 72 horas. No plasma, a meia vida é de 2 a 3 horas, principalmente pela sua conversão em aloxantina, sendo 10% de uma dose excretada de forma inalterada na urina. A meia-vida de seu metabólito é de 18 a 30 horas, quando a função renal é normal, sendo, portanto, vagorosamente eliminada na urina (INSEL,1996). Tanto o alopurinol como a aloxantina não se ligam às proteínas e distribuem-se pela água tecidual de uma maneira relativamente uniforme, com exceção do cérebro, onde sua concentração é cerca de 1/3 daquela alcançada em outros tecidos. As reações de hipersensibilidade representam os efeitos adversos mais comuns (INSEL,1996).

A principal ação proposta para os efeitos benéficos do alopurinol, na redução do dano e mortalidade pós isquemia e reperfusão observada em estudos experimentais, reside no fato desta substância ter a capacidade de inibir a enzima xantina oxidase, que catalisa de modo irreversível a transformação da hipoxantina em xantina, proveniente do catabolismo de compostos energéticos de purina tais como o ATP, ADP, AMP (CUNNINGHAM et al.,1974; PARKS et al.,1983; PALLER et al.,1984; McCORD, 1985; COHEN,

1992; DREWS et al., 1995). Portanto, interrompendo esta rota de degradação ocorre a preservação dos metabólitos purinérgicos, permitindo a ressíntese do ATP durante a fase de revascularização, restabelecendo assim, pelo menos em parte, o nível energético para a manutenção dos eventos metabólicos que se processam em nível celular e subcelular (CUNNINGHAM et al.,1974; PALLER et al.,1984; KARWINSKI et al.,1991; DI LISA et al.,1995). Entretanto, os seus prováveis efeitos benéficos residiriam, principalmente, na sua capacidade de inibir a geração de EAO no período reperfusional do que propriamente na manutenção dos níveis de adenosina, tendo em vista ser a enzima xantina oxidase fundamental no processo de formação das espécies radicais reativas (ZAGER & GMUR ,1989; KARWINSKI et al., 1991; GREENE & PALLER, 1992; COHEN, 1992; KARWINSKI et al.,1993).

Os efeitos do alopurinol têm sido demonstrados em várias situações de isquemia e hipóxia tecidual induzidas, experimentalmente, em animais de laboratório com resultados as vezes conflitantes (CUNNINGHAM et al.,1974; PARKS et al.,1983; ZAGER & GMUR,1989; KARWINSKI et al.,1991; MARUBAYASHI et al.,1991; COHEN, 1992; GREENE & PALLER, 1992; KARWINSKI et al.,1993; RINALDI et al.,1995; GÜRKE et al.,1995).

Portanto, a isquemia e reperfusão são amplamente reconhecidas como situações caracterizados por eventos extremamente complexos que envolvem praticamente todos os componentes celulares por distintos mecanismos, todos potencialmente lesivos. Entretanto, aquele que ultima ou que torna irreversível

o dano celular e que a leva a morte e extremamente controverso (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

2. OBJETIVOS

2.1 PRINCIPAL

Determinar o dano causado pela isquemia e reperfusão sobre o fígado, em normotermia, e os possíveis efeitos do alopurinol neste fenômeno.

2.2 SECUNDÁRIOS

-Desenvolver e validar a técnica da determinação da lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos, pelos métodos do TBARS(Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e da Quimiluminescência, em animais submetidos a isquemia e reperfusão hepática, como forma de avaliação de dano hepático.

-Avaliar os efeitos da isquemia normotérmica transitória sobre a lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos e os efeitos do pré-tratamento dos animais com alopurinol.

-Avaliação histopatológica dos efeitos da isquemia normotérmica transitória hepática em animais controles e pré-tratados com alopurinol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para este estudo experimental randomizado duplo cego foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, pesando entre 250 e 350 gramas, criados no Biotério da Disciplina de Farmacologia e Toxicologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Os animais foram mantidos em número de 6 em gaiolas plásticas com dimensões de 47 X 34 X 18 cm, em sala com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e, ciclo claro de luz das 7 às 19h , recebendo ração padronizada (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) e água "ad libitum".

3.2 FÁRMACOS

Suspensão de alopurinol (Zyloric, 100mg por comprimido, Glaxo Welcome, Brasil) 25 mg/ ml, preparada em solução fisiológica e administrada

em duas doses de 50mg/Kg de peso do animal 5 e 1 horas antes do procedimento cirúrgico. Como solução controle foi utilizada a solução fisiológica em volumes semelhantes. As drogas foram administradas em um volume fixo de 1 ml / Kg intraperitonealmente (i.p)

Como anestésico utilizou-se uma solução composta por partes iguais (1:1) de Cloridrato de Xilasiña 20 mg/ ml (Kensol, Köning, Industria Argentina) e Cloridrato de Quetamina 50 mg/ ml (Vetanarcol, Köning, Industria Argentina), administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1ml/ Kg.

3.3 ANATOMIA CIRÚRGICA DO FÍGADO DE RATOS

O fígado de ratos é composto, basicamente, por 4 lobos principais, ou seja, lobo hepático lateral direito, lateral esquerdo e o mediano, sendo este último dividido em dois por uma cissura longitudinal, em lobo hepático central direito e central esquerdo. Anatomicamente o lobo lateral esquerdo e o mediano forma uma unidade, que corresponde a aproximadamente 75% do órgão, podendo ser extirpado como um todo. O pedículo hepático é composto pela veia porta, artéria hepática e ducto biliar e vasos linfáticos, todos estes elementos quando se dirigem cranealmente sofrem ramificações de modo que cada lobo hepático

apresenta um sistema pedicular individualizado. A drenagem sangüínea venosa é composta pelas veias supra-hepáticas de cada lobo, que desembocam na veia cava inferior. Inferiormente o pedículo hepático principal encontra-se no interior do ligamento hepatoduodenal e, superiormente temos o ligamento falciforme e triangular.

3.4 TÉCNICA CIRÚRGICA DE ISQUEMIA HEPÁTICA

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com a solução anestésica descrita na dose de 1ml/ kg. Após o estabelecimento de um nível anestésico apropriado, perda de reflexos das vibrissas nasais, os animais foram colocados em decúbito dorsal, sobre mesas cirúrgicas especialmente confeccionadas para animais de pequeno porte, sendo suas 4 patas fixadas com material elástico. Imediatamente após, efetuou-se uma laparotomia mediana com aproximadamente 4 cm de extensão e stendendo-se do apêndice xifóide em sentido caudal. Após adequada exposição da cavidade abdominal, seccionou-se o ligamento falciforme e com o uso de afastadores do tipo Farabeuf, o fígado do animal foi apropriadamente individualizado. Com manobras digitais delicadas o lobo hepático mediano foi rebatido em sentido craneal permitindo, uma perfeita exposição do sistema pedicular do fígado composto pela veia porta, artéria e ducto biliar com suas

respectivas ramificações para cada um dos lobos hepáticos. Para efetuar o pinçamento pedicular foram utilizadas pinças vasculares traumáticas (EDLO- 7-794).

Isquemia hepática intermitente total : nestes animais todo o fígado foi submetido a uma isquemia, através do pinçamento de todo pedículo imediatamente abaixo de sua primeira ramificação hepática e logo acima de sua emergência hepatoduodenal, por um tempo total de 45 minutos, divididos em intervalos de 15 minutos , sendo nos dois primeiros permitida a reperfusão durante 5 minutos.

Isquemia hepática intermitente seletiva: nestes animais o fígado foi submetido a isquemia seletiva do lobo mediano e lateral esquerdo, por um período de tempo total de 45 minutos. Para tanto, o pinçamento foi efetuado imediatamente abaixo das ramificações dos vasos para estes lobos, permitindo entretanto um livre fluxo sanguíneo para o lobo hepático direito. Os canalículos biliares foram incluídos neste pinçamento.

3.5 TÉCNICA CIRÚRGICA DE HEPATECTOMIAS EM RATOS

As hepatectomias foram realizadas conforme técnica descrita por HIGGINS E ANDERSON (1931), que compreende nos seguintes passos: inicialmente com manobra digital o(s) lobo(s) hepático(s) de interesse é/são suspenso(s) através de uma delicada tração em sentido vertical enquanto um fio de Seda 4.0 (Ethicon SSP 14) envolve a base dos mesmos com a realização de nós, o que permite a ligadura da(s) artéria(s), veia(s) e canalículo(s) biliar(es), permitindo a seguir secção com tesoura do tecido hepático acima da ligadura, sem sangramento.

Após terem sido efetuados os procedimentos cirúrgicos de interesse, a incisão cirúrgica foi fechada com sutura, em camada única e de forma contínua, utilizando-se para tal fio monofilamentar (Mononylon 3.0- Ethicon 14503 T).

Imediatamente ao final do procedimento, após fechada a incisão cirúrgica, eram administrados 2 ml de soro fisiológico por via intraperitoneal para re-hidratação.

3.6 EXPERIMENTOS REALIZADOS

3.6.1 EXPERIMENTO 1: Estudo da determinação da atividade das enzimas séricas hepáticas, transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (TGO) e fosfatase alcalina (FA), em ratos submetidos a isquemia com ou sem hepatectomia.

Objetivo: avaliar os efeitos da isquemia individualmente, assim como, da hepatectomia e da isquemia e hepatectomia sobre a atividade das enzimas hepáticas, utilizadas como marcadoras do grau de lesão do fígado, com o intuito de se determinar a contribuição de cada procedimento na intensidade do dano causado à economia hepática.

Neste estudo foram utilizados 32 ratos, divididos em 4 grupos de 8 animais cada:

GRUPO I (Controle): Neste grupo os animais foram anestesiados e preparados conforme descrição prévia e, a seguir submetidos a laparotomia mediana de aproximadamente 4 cm. Após um período de tempo de 45 minutos fechou-se a cavidade abdominal com sutura contínua utilizando-se fio de

monofilamentar 2.0, ao final da qual administrou-se 2 ml de soro fisiológico por via intraperitoneal (i.p.).

GRUPO II (Isquemia): Neste grupo os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no Grupo I, porém imediatamente após a laparotomia, efetuou-se isquemia intermitente troncular total através do pinçamento do pedículo hepatoduodenal, como descrito anteriormente, por um período de tempo de 45 minutos, sendo permitida a reperfusão por 5 minutos após os dois primeiros intervalos de 15 minutos. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2ml de soro fisiológico por via i.p.

GRUPO III (Hepatectomia): Neste grupo de animais efetuou-se os mesmos procedimentos descritos no Grupo I, porém imediatamente após o período de tempo de 45 minutos, efetuou-se a ressecção dos lobos hepáticos médios. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2 ml de soro fisiológico por via i.p.

GRUPO IV (Isquemia e hepatectomia): Neste grupo de animais, além dos procedimentos descritos no Grupo II, adicionou-se a ressecção dos lobos hepáticos médios, imediatamente após o período de clameamento. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2 ml de soro fisiológico por via i.p.

As coletas de sangue foram efetuadas 12, 24, 48, 72, 96, 120 horas após a cirurgia e, no 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico.

Para obtenção das amostras de sangue, necessárias às dosagens bioquímicas, os animais foram submetidos a anestesia inalatória com éter etílico, em campânula de vidro fechada, até um nível anestésico apropriado (perda do reflexo dos pêlos das narinas) e submetidas a punção do plexo arteriovenoso retro-ocular com um capilar de vidro através do qual o sangue fluiu para o interior de um tubo de ensaio. Cada coleta era composta de aproximadamente 0,5 ml de sangue. Imediatamente após a coleta era administrado o mesmo volume de soro fisiológico por via intraperitoneal. As amostras de sangue foram, imediatamente após a coleta, centrifugadas a 1000 rotações por minuto durante 20 minutos, permitindo assim a separação do plasma, no qual determinou-se a atividade da creatinina sérica.

As determinações das atividades das enzimas séricas hepáticas (transaminase oxalo-acética, transaminase oxalo-pirúvica e fosfatase alcalina) foram realizadas por técnicas colorimétricas em espectrofotômetro (CELM, E 210 D), utilizando-se Kits Labtest Sistemas para Diagnóstico Ltda (Brasil) no laboratório de bioquímica da Disciplina de Farmacologia e

Toxicologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

3.6.2 EXPERIMENTO 2: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares do hepatócitos, pelos Métodos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) e da Quimiluminescência (QL), de ratos submetidos a isquemia hepática em diferentes tempos de reperfusão sangüínea.

Objetivo: Avaliar se a reperfusão, assim como a influência de diferentes intervalos de tempo da mesma sobre a intensidade de lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos.

Para este estudo foram utilizados 24 animais divididos em 4 grupos com 6 ratos cada:

GRUPO I (Controle): Neste grupo os animais foram anestesiados e submetidos a laparotomia mediana conforme descrição prévia e, após 1 hora, efetuou-se a ressecção do lobo médio do fígado para realização das medidas de LPO. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2 ml de soro fisiológico por via i.p.

GRUPO II (Isquemia): Neste grupo os animais, após anestesiados e laparotomizados, de modo semelhante ao anterior, foram submetidos à interrupção seletiva contínua do fluxo sanguíneo hepático dos lobos mediano e esquerdo, abrangendo 70% do tecido hepático, durante 1 hora. Imediatamente após este período de tempo, efetuou-se a ressecção dos lobos hepáticos isquêmicos, não tendo sido permitida a reperfusão sangüínea dos mesmos. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2 ml de soro fisiológico.

GRUPO III (Isquemia e reperfusão de 30 minutos): Neste grupo de animais, além dos procedimentos já descritos anteriormente, permitiu-se a reperfusão sangüínea dos lobos hepáticos, previamente isquêmicos, por um período de tempo de 30 minutos, no final dos, quais realizou-se a remoção dos mesmos. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2 ml de soro fisiológico por via i.p.

GRUPO IV (Isquemia e reperfusão de 1 hora): Nestes animais os procedimentos semelhantes aos já descritos foram efetuados permitindo-se porém a reperfusão por um intervalo de tempo de 1 hora, e no final deste, removeu-se os lobos hepáticos previamente isquêmicos. Após o fechamento da cavidade administrou-se 2 ml de soro fisiológico, por via i.p.. Imediatamente

após a hepatectomia o tecido hepático foi seccionado várias vezes e lavado 10 vezes em tampão fosfato, identificado e acondicionado em tubos de plástico e mergulhado em nitrogênio líquido para congelamento, evitando ao máximo o tempo de contato com o ar atmosférico.

Após descongelamento em temperatura ambiental o tecido hepático foi homogeneizado na proporção de 9 ml de KCL 1,15% para cada grama de tecido em um homogeneizador Ultra Turrax, durante 1 minuto à temperatura de 0-2 °C. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B- Rotor SM 24) por 10 minutos à 1000g (OHKAWA et al.,1979; LLESUY et al.,1985). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante utilizado para a medida de lipoperoxidação (LPO) pelos métodos do TBA-RS e QL.

Método do TBARS

Este método consiste em incubar o material biológico com ácido tiobarbitúrico, em meio ácido, e medir espectrofotometricamente, a formação de malondialdeído derivado da lipoperoxidação que se constitui em um pigmento rosa (BUEGE & AUST, 1978; OHKAWA et al.,1979). Os valores obtidos são expressos em nmol/ mg de proteína, utilizando um coeficiente de extinção= 156 mM⁻¹ cm⁻¹.

- TBA-RS no homogeneizado de tecido hepático

Para o método do TBA-RS no homogeneizado do tecido hepático colocou-se 0,5 ml deste material biológico em 1,5 ml de ácido tricloroacético(TCA) à 10%, 1,0 ml de ácido tiobarbitúrico (Sigma, St. Louis, MO, USA) à 0,67% e 0,5 ml de água destilada para completar o volume adequado à cubeta do espectrofotômetro. Agitou-se cada tubo por 10 segundos e incubou-se à 100 °C por 15 minutos. Após a fervura, verificou-se a formação de um produto rosado. Os tubos foram, em seguida, resfriados e lhes foi acrescentado 3,0 ml de butanol e, novamente, procedeu-se a agitação por 40 segundos. Após, foram centrifugados por 10 minutos à 2500 rpm. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi utilizado para leitura no espectrofotômetro(535 nm) (BUEGE & AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979)

Cálculo:

$$C = \frac{AX \text{ diluição}/E}{P}$$

onde:

C= concentração de TBA-RS em nmol/mg de proteína

A= absorvância da amostra

E= $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

diluição/E= 38,46

P = Concentração tecidual de proteínas.

Método da Quimiluminescência (QL)

Quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de terbutil consiste na adição de um hidroperóxido orgânico sintético (hidroperóxido de terbutil) ao homogeneizado do material biológico em estudo (tecido hepático) (GONZALES-FLECHA, LLESUY & BOVERIS,1991). Os resultados relacionam-se a valores baseados em contas por segundo por miligrama(cps/mg de proteína) de energia luminosa emitida pelo retorno ao estado fundamental de carbonilas excitadas e oxigênio singlet durante a LPO. Em tecidos submetidos a stress oxidativo, o valor da QL iniciada por hidroperóxido de ter-butil (t-BOOH) é maior que o valor correspondente a este tecido em condições fisiológicas (pré-stress), de modo que a relação QL pós-stress/QL pré-stress, resulta maior do que 1.0 ± 0.1 (GONZALES-FLECHA, LLESUY & BOVERIS,1991).

Os homogeneizados dos tecidos hepáticos, obtidos conforme descrito, foram colocados em viais de vidro de 25mm de diâmetro por 50mm de altura, com tampão fosfato (K Cl 140 nM, 20 nM de fosfatos- pH 7,4), concentração de proteínas do homogeneizado de aproximadamente 1 mg/ml, na presença de hidroperóxido de terbutil (3mM). Para evitar a fosforescência dos viais ativadas pela luz fluorescente, estes foram conservados ao abrigo da luz e a técnica era desenvolvida em ambiente escuro. A emissão da luz(QL) obtida na reação foi

medida em um contador de cintilação(LKB - Rack Beta- Liquid Scintillation Spectrometer- 1215, LKB Produkter, AB, Bromma, Sweden), com circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio (GONZALES-FLECHA, LLESUY & BOVERIS,1991)

Cálculo:

$$QL = \frac{(Q_{\text{máx.}} - Q_{\text{basal}}) \times 4 \times 2}{(P) \times 0,5 \times 60}$$

Onde:

QL=Quimiluminescência em cps/ mg de proteína (contas por segundo por miligrama de proteínas).

Ql basal=Quimiluminescência basal.

Qlmáx.= Quimiluminescência máxina.

P=Concentração tecidual de proteínas.

DOSAGEM DAS PROTEÍNAS NO TECIDO HEPÁTICO

A concentração de proteína no tecido hepático foi medida pelo método de Lowry (LÖWRY et al., 1951). Este método utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/ml. Colocou-se 20 µl do homogeneizado em 0.8ml de água destilada e 2.0ml do reativo C. Este último era preparado no momento e consistia na mistura de 50ml do reativo A

(NaHCO₃ 2% em NaOH 0.10N), 0.5ml do reativo B1 (CuSO₄ .5H₂O 1%) e 0.5ml do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Aguardava-se 10 minutos e, após este período, colocava-se 0.2ml de reagente de Folin (na concentração de 1/3 em água destilada). Após 30 minutos, desenvolvia-se cor azul que pode ser medida espectrofotometricamente a 625nm.

Fórmula:

$$CP = L \times F \times D$$

Onde:

CP= Concentração de proteína em mg/ ml

L= Leitura obtida no espectrofotômetro

F= Fator de Correção = (Volume ÷ Absorbância) ÷3

D= Diluição (50 vezes)

3.6.3 EXPERIMENTO 3: Estudo das variações das atividades das enzimas transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (TGO) e fosfatase alcalina(FA), assim como da mortalidade de ratos submetidos a isquemia hepática seletiva, tratados e não com alopurinol.

Objetivo: Determinar os efeitos da isquemia seletiva em animais pré-tratados e não com alopurinol, inibidor da enzima xantina oxidase (geradora de

espécies ativas do oxigênio) sobre a atividade das enzimas hepáticas, utilizadas como marcadoras do grau de dano ao fígado.

Neste estudo utilizou-se 30 ratos divididos em 3 grupos de 10 animais:

GRUPO I (Controle): Neste grupo os animais receberam 50 mg e 25mg/Kg de alopurinol, preparado em solução conforme descrição prévia, administrado por via intraperitoneal 5 e 1 hora antes da cirurgia, respectivamente. Após a anestesia e laparotomia, os animais permaneceram com o ventre aberto por um período de 45 minutos ao final do qual efetuou-se o fechamento da cavidade abdominal conforme descrito anteriormente. Além disso, os animais receberam 2 ml de soro fisiológico, para rehidratação, por via i.p., no final do procedimento.

GRUPO II (Isquemia e alopurinol): Neste grupo de animais, além dos procedimentos descritos anteriormente (grupo 1), efetuou-se a interrupção sangüínea seletiva dos lobos hepáticos médio e esquerdo por um período de tempo total de 45 minutos. Ao final deste intervalo de tempo a pinça foi removida e a cavidade abdominal fechada, como já descrito e, administrados 2 ml de soro fisiológico por via i.p.

GRUPO III (Isquemia): Nestes animais foram efetuados os mesmos procedimentos descritos anteriormente no Grupo II , porém não receberam a solução de alopurinol.

As coletas de sangue foram efetuadas 12, 24, 48, 72 horas após a cirurgia e a determinação de sua atividade foram realizadas conforme descrito anteriormente.

3.6.4 EXPERIMENTO 4: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, pré-tratados e não com alopurinol.

Objetivo: Avaliar o efeito do alopurinol sobre a formação das espécies ativas do oxigênio e o conseqüente grau de lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos.

Neste estudo utilizou-se 30 animais, divididos em 3 grupos de 10 ratos cada:

GRUPO I (Controle): Estes animais receberam alopurinol conforme já descrito no Experimento 3 e, após a anestesia e a laparotomia seus ventres permaneceram abertos por um período de tempo de 1 hora e 50 minutos, ao final dos quais removeu-se o lobo mediano. Os animais foram a seguir sacrificados.

GRUPO II (Isquemia e reperfusão hepática + alopurinol): Neste grupo de animais além dos procedimentos efetuados no grupo I, foi efetuada a interrupção sangüínea seletiva para os lobos hepáticos médio e esquerdo, por um período de tempo total de 45 minutos. Após este intervalo de tempo, e reperfusão sangüínea por 1 hora realizou-se a ressecção do lobo hepático mediano. Os animais foram, a seguir, sacrificados.

GRUPO III (Isquemia e reperfusão): Neste grupo de animais foram efetuados os mesmos procedimentos descritos nos Grupo II, porém não receberam solução de alopurinol antes do procedimento cirúrgico.

Os espécimes dos fígados removidos foram submetidos aos procedimentos descritos no Experimento 2.

3.6.5 EXPERIMENTO 5: Avaliar a taxa de mortalidade de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol.

Objetivo: Determinar os efeitos da isquemia seletiva em animais pré-tratados e não com alopurinol, inibidor da enzima xantina oxidase (geradora de espécies ativas do oxigênio) sobre a mortalidade dos animais.

Neste estudo utilizou-se 30 ratos divididos em 3 grupos de 10 animais:

GRUPO I (Controle): Neste grupo os animais receberam 50 mg e 25mg/Kg de alopurinol, preparado em solução conforme descrição prévia, administrado por via intraperitoneal 5 e 1 hora antes da cirurgia, respectivamente. Após a anestesia e laparotomia, os animais permaneceram com o ventre aberto por um período de 45 minutos ao final do qual efetuou-se o fechamento da cavidade abdominal conforme descrito anteriormente. Além disso, os animais receberam 2 ml de soro fisiológico, para rehidratação, por via i.p., no final do procedimento.

GRUPO II (Isquemia e alopurinol): Neste grupo de animais, além dos procedimentos descritos anteriormente (grupo 1), efetuou-se a interrupção sangüínea seletiva dos lobos hepáticos médio e esquerdo por um período de

tempo total de 45 minutos . Ao final deste intervalo de tempo, a pinça foi removida e a cavidade abdominal fechada, como já descrito e, administrados 2ml de soro fisiológico por via i.p.

GRUPO III (Isquemia): Nestes animais foram efetuados os mesmos procedimentos descritos anteriormente no Grupo II , porém não receberam a solução de alopurinol.

Estes animais foram acondicionados em gaiolas e observados durante um período de 10 dias, sendo a mortalidade pós-operatória avaliada a cada 24 horas.

3.6.6 EXPERIMENTO 6: Estudo das alterações histopatológicas dos fígados de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol , em diferentes períodos do pós-operatório.

Objetivo: Avaliar as alterações histológicas decorrentes dos efeitos da isquemia e reperfusão em animais tratados ou não com alopurinol, principalmente no que se refere a presença de necrose hepatocelular e sua evolução em diferentes períodos do pós-operatório.

Neste estudo utilizou-se 60 ratos divididos em 3 grupos com 20 animais cada:

GRUPO I (Controle): Composto por 20 animais que foram submetidos ao mesmo procedimento realizados nos ratos do GRUPO I do EXPERIMENTO 4. As 24, 48, 72 e 96 horas submeteu-se, em cada um dos intervalos de tempo, 5 ratos a ressecção do lobo hepático mediano.

GRUPO II (Isquemia e alopurinol): Também submetidos aos mesmos procedimentos realizados nos ratos do GRUPO II do EXPERIMENTO 4 e, como no grupo anterior hepatectomia do lobo mediano em diferentes períodos de tempo do pós-operatório.

GRUPO III (Isquemia): Estes animais foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados nos ratos do GRUPO III do EXPERIMENTO 4 e, hepatectomia do lobo mediano em diferentes períodos de tempo do pós-operatório, conforme descrito no grupo I.

As alterações histológicas foram avaliadas por estudo anatomo-patológico dos fígados dos animais submetidos à isquemia e posteriormente à reperfusão. Imediatamente após ressecado o fígado foi incisado várias vezes

para permitir a penetração adequada do fixador, identificado e acondicionado em recipientes contendo formol a 10% (fixador); após, esse material foi colocado em álcool etílico a 100% por 12 horas, em seguida no Xilol e depois preparado para inclusão em parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo e este material foi disposto sobre lâminas de vidros e corados pelo corante de Hematoxilina-Eosina, sendo a seguir analisadas em microscopia óptica com auxílio de um Médico-Patologista, que não era conhecedor dos grupamentos aos quais pertenciam os tecidos analisados.

Para fins de avaliação e quantificação das alterações decorrentes da isquemia sobre as seguintes características histológicas: congestão vascular (sinusoidal, centro-lobular e espaço porta), necrose e esteatose hepática.

A quantificação da intensidade das características analisadas foi expressa em cruces (0 a 3+), obtida através da média de três campos microscópicos, aleatórios, avaliados em um aumento de 200 vezes, considerando-se:

0 : ausência de alterações

1+: alterações de intensidade leve (menos de 25% do campo analisado).

2+: alterações de intensidade moderada (25 a 50% do campo analisado).

3+: alterações de intensidade severa (mais de 50% do campo analisado).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados referentes a atividade funcional ALT, AST e FA e lipoperoxidação das membranas celulares das células do parênquima renal, através dos métodos do TBA-RS e da QL, em animais tratados, e não, com alopurinol foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, considerando para efeitos de significância estatística um $\alpha = 5\%$ (Siegel, 1979).

A variabilidade da mortalidade entre os distintos grupos foi analisada pelo Teste do Qui-quadrado, considerando-se para fins de significância estatística um $\alpha = 5\%$ (Siegel, 1979).

Os dados obtidos referentes aos estudos histopatológicos dos tecidos hepáticos dos ratos foram expressos através de mediana e analisados estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn, considerando para efeitos de significância estatística um $\alpha = 5\%$ (Siegel, 1979).

3.8 NORMAS BIOÉTICAS ADOTADAS NO TRABALHO COM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Todos os experimentos efetuados com os animais (ratos) foram realizados em laboratório especialmente adaptado para o trabalho com animais e, por pessoas com experiência no manuseio cirúrgico de animais de experimentação. Além disso os animais foram mantidos em um Biotério especialmente projetado para o fim proposto. As normas gerais, brasileiras e internacionais, que regem a experimentação com animais foram seguidas (GOLDIN, 1995 ; LANZIOTTI et al., 1994).

4. RESULTADOS

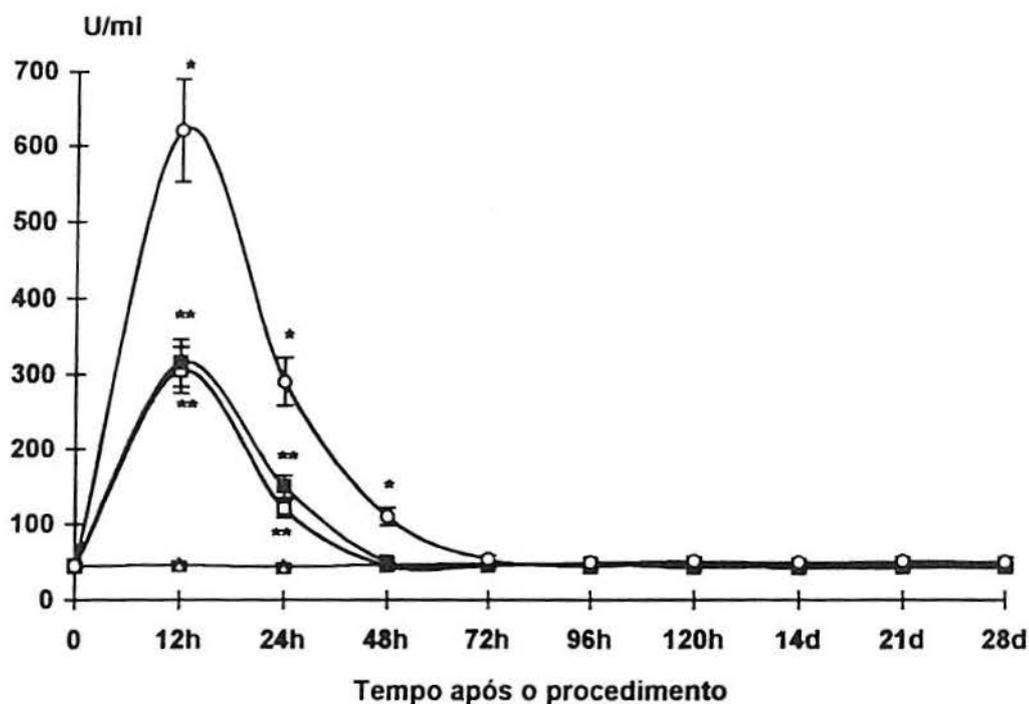
4.1 EXPERIMENTO 1: Estudo da determinação da atividade das enzimas séricas hepáticas, transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT, TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) e fosfatase alcalina (FA), em ratos submetidos a isquemia com ou sem hepatectomia.

Observou-se um aumento estatisticamente significativo da concentração sérica da AST (TGO) e ALT (TGP) nas medidas realizadas as 12 e 24 horas, após a cirurgia, dos Grupos II (isquemia), III (hepatectomia) quando comparados com o Grupo I (controle), sendo também significativa a diferença quando comparadas as medidas das 12, 24 e 48 horas do Grupo IV (hepatectomia+isquemia) em relação àquelas dos demais grupos ($p < 0.05$). Após este período de tempo as concentrações séricas das enzimas dos Grupos II, III e IV atingiram valores semelhantes aos do grupo controle (Grupo I) ($p > 0.05$). Quando se considerou a soma dos valores da AST e ALT dos

Grupos II e III e comparados aos do Grupo IV, no período das primeiras 48 horas, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$), o que reflete um efeito aditivo da injúria advinda da hepatectomia com o da isquemia individualmente.

Diferença estatisticamente significativa nos valores da concentração sérica da FA dos Grupos III e IV em relação aos Grupos I e II, foram observadas em todas as medidas efetuadas, sendo mais pronunciado no período compreendido entre as medidas efetuadas 120 horas e 21 dia após a cirurgia ($p < 0.05$). Os resultados estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3 e nos Gráficos 1, 2 e 3.

CONCENTRAÇÃO SÉRICA TGP



—▲— RATOS CONTROLE	—□— RATOS ISQUEMIA
—■— RATOS HEPATECTOMIA	—○— RATOS ISQUEMIA+HEPATECTOMIA

Gráfico 1- Representação gráfica das variações nas concentrações séricas da transaminase glutâmico oxalo-acética (ALT, TGP), em diferentes períodos de tempo, após os diferentes procedimentos cirúrgicos hepáticos efetuados em ratos.

* Diferença estatisticamente significativa quando comparado o Grupo IV com os demais grupos. ** Diferença estatisticamente significativa quando comparados os Grupos II e III com o grupo I. Análise de Variância, seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I - Controle, Grupo II- Isquemia hepática, Grupo III- Hepatectomia, Grupo IV- Isquemia hepática e

Hepatectomia.

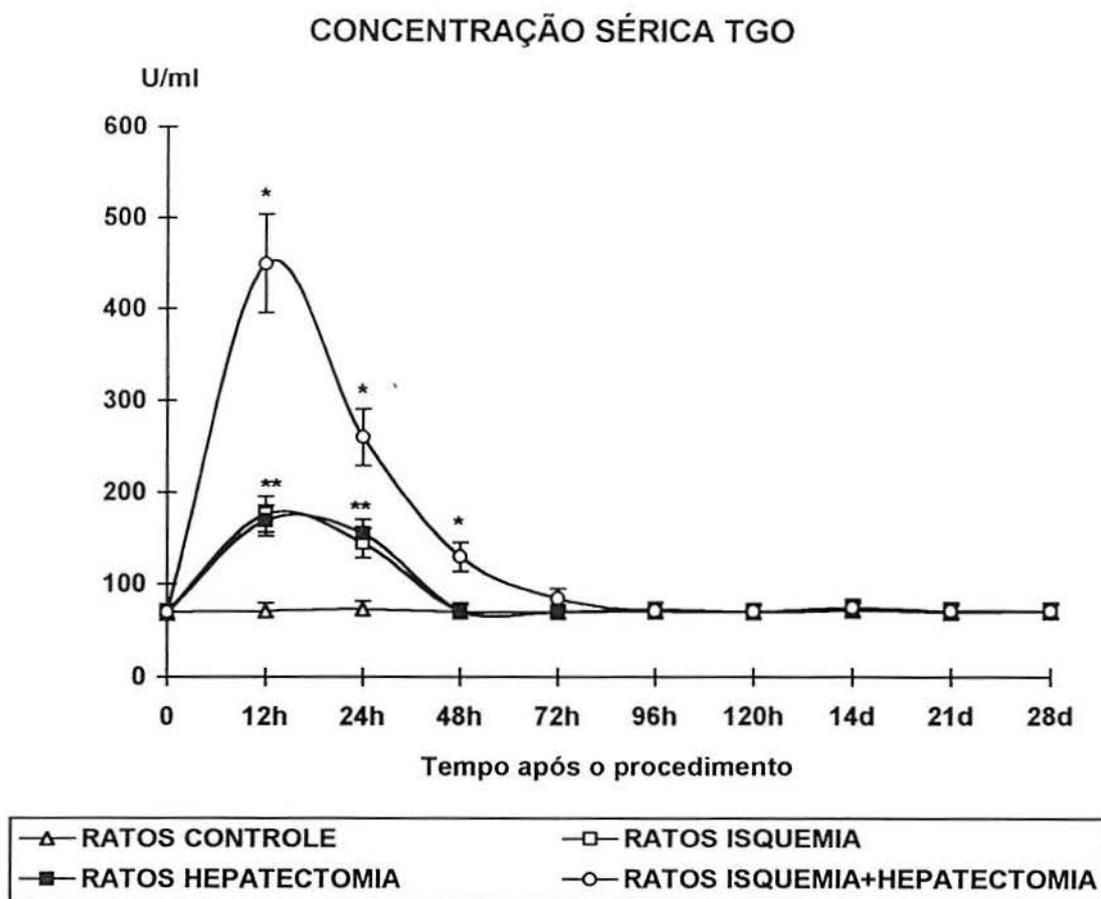


Gráfico 2- Representação gráfica das variações nas concentrações séricas da transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO), em diferentes períodos de tempo, após os diferentes procedimentos cirúrgicos hepáticos efetuados em ratos.

* Diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle, isquemia e hepatectomia. ** diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle. Análise de Variância, seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle,

Grupo II- Isquemia hepática, Grupo III- Hepatectomia, Grupo IV- Isquemia hepática e hepatectomia.

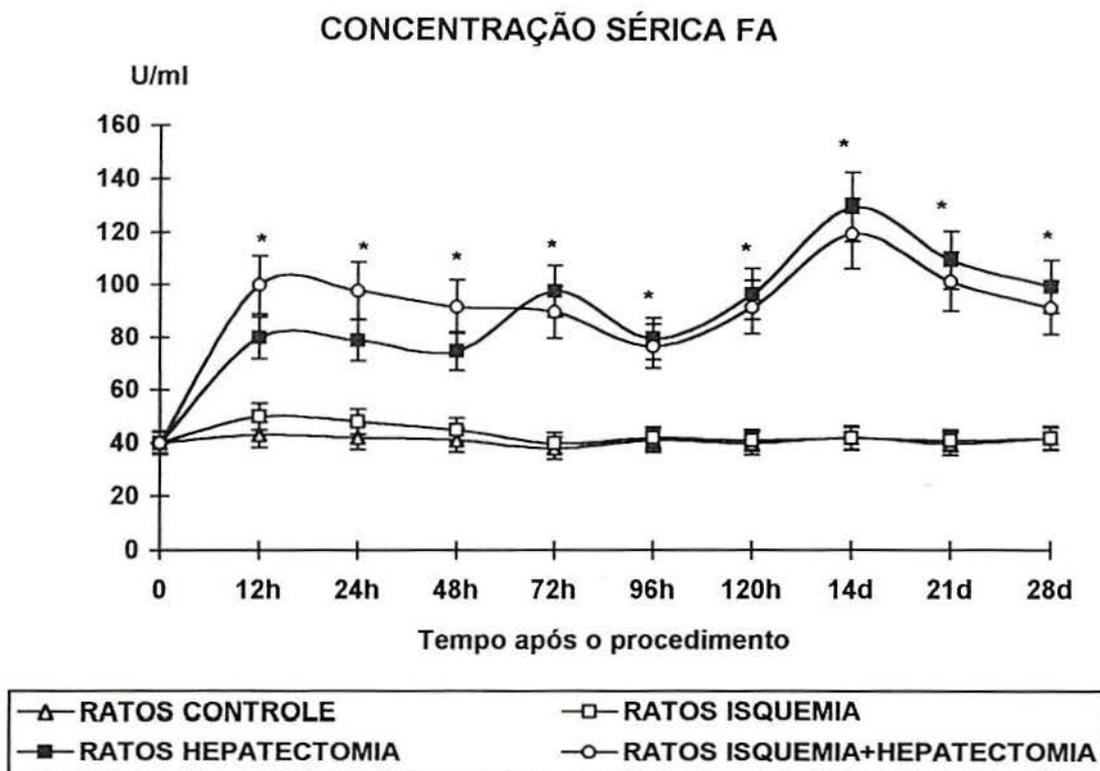


Gráfico 3- Representação gráfica das variações nas concentrações séricas da fosfatase alcalina (FA), em diferentes períodos de tempo, após os diferentes procedimentos cirúrgicos hepáticos efetuados em ratos.

*Diferença estatisticamente significativa quando comparados os III e IV com os grupos I e II. Análise de Variância(ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle, Grupo II- Isquemia hepática, Grupo III- Hepatectomia, Grupo IV- Isquemia hepática e hepatectomia.

4.2 EXPERIMENTO 2: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares do hepatócitos, pelos Métodos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) e da Quimiluminescência (QL), de ratos submetidos a isquemia hepática em diferentes tempos de reperfusão sangüínea.

Os resultados obtidos através do método do TBA-RS, que mede a formação de malondialdeído, mostraram uma maior concentração tecidual hepática deste nos Grupos III e IV em relação aos Grupos I e II ($p < 0.05$). Entre os Grupos I e II e, entre os Grupos III e IV não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$). Os dados estão expressos nas Tabelas 4 e 5 e Gráfico 4.

Tabela 4 - Efeitos da isquemia e da reperfusão, em diferentes períodos de tempo, sobre a formação de malondialdeído no tecido hepático.

	<i>Malondialdeído (nmol/mg de proteína)</i>
GRUPO I	0,156 ± 0,04
GRUPO II	0,190 ± 0,016
GRUPO III	0,245 ± 0,017*
GRUPO IV	0,273 ± 0,022*
F _(5%, 23)	25,46

*Diferença estatisticamente significativa dos Grupos III e IV em relação aos Grupos I e II ($p < 0.05$).

Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%.

Grupo I: Controle, Grupo II: Uma hora de isquemia hepática, Grupo III: Uma hora de isquemia hepática

e 30 minutos de reperfusão, Grupo IV: Uma hora de isquemia hepática e 1 hora de reperfusão.

Tabela 5 - Efeitos da isquemia e da reperfusão, em diferentes períodos de tempo, sobre a energia luminosa emitida pelas carbonilas excitadas no tecido hepático medido pelo método da quimiluminescência (QL) .

	<i>Quimiluminescência (cps/mg de proteína)</i>
GRUPO I	3695 ± 547
GRUPO II	4105 ± 486
GRUPO III	6102 ± 346*
GRUPO IV	6285 ± 298*
$F_{(5\%,23)}$	57,65

*Diferença estatisticamente significativa dos Grupos III e IV em relação aos Grupos I e II ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I: controle, Grupo II: 1 hora de isquemia hepática, Grupo III: Uma hora de isquemia hepática e 30 minutos de reperfusão, Grupo IV: Uma hora de isquemia hepática e 1 hora de reperfusão.

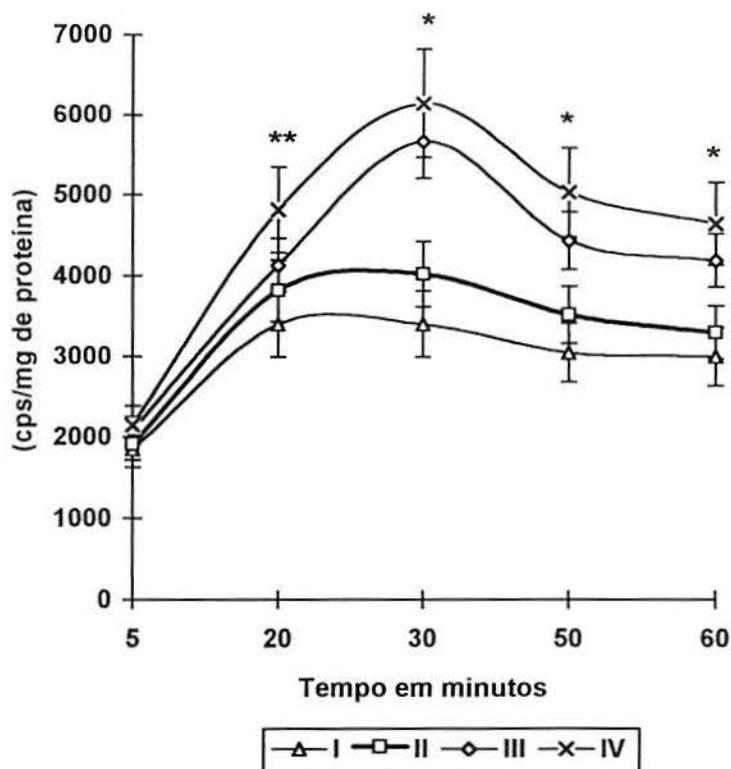


Gráfico 4- Representação gráfica do perfil cinético da quimiluminescência, iniciada por hidroperóxido de tert-butil, demonstrando a média dos valores máximos de energia luminosa emitida pelos tecidos hepáticos, em cada período de tempo, pelos diferentes grupos.

*Diferença estatisticamente significativa quando comparados os Grupo III e IV com os Grupos I e II ($p < 0.05$). ** Diferença estatisticamente significativa quando comparado o Grupo IV com os Grupos I, II e III ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I: controle, Grupo II: 1 hora de isquemia hepática, Grupo III: Uma hora de isquemia hepática e 30 minutos de reperfusão, Grupo IV: Uma hora de isquemia hepática e 1 hora de reperfusão.

4.3 EXPERIMENTO 3: Estudo das variações das atividades das enzimas transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT,TGP), transaminase glutâmico oxalo-acética (AST,TGO) e fosfatase alcalina (FA), em ratos submetidos a isquemia hepática seletiva, tratados, e não, com alopurinol.

Neste experimento observou-se uma concentração sérica da enzima transaminase oxalo-pirúvica (ALT,TGP) e oxaloacética (AST,TGO) significativamente superior nos Grupos II e III em relação ao Grupo I (controle) nas determinações efetuadas as 12 e 24 horas após a isquemia hepática($p < 0.05$). Na medida das 48 horas a concentração sérica da ALT e AST foram significativamente superiores no Grupo III quando comparada com as concentrações dos Grupos I e II ($p < 0.05$). Em relação a fosfatase alcalina (FA), observou-se apenas uma concentração maior da mesma no Grupo I em relação aos Grupos II e III na determinação das 72 horas(* $p < 0.05$).

Os dados estão expressos nas Tabelas 6, 7 e 8 e Gráficos 5, 6 e 7.

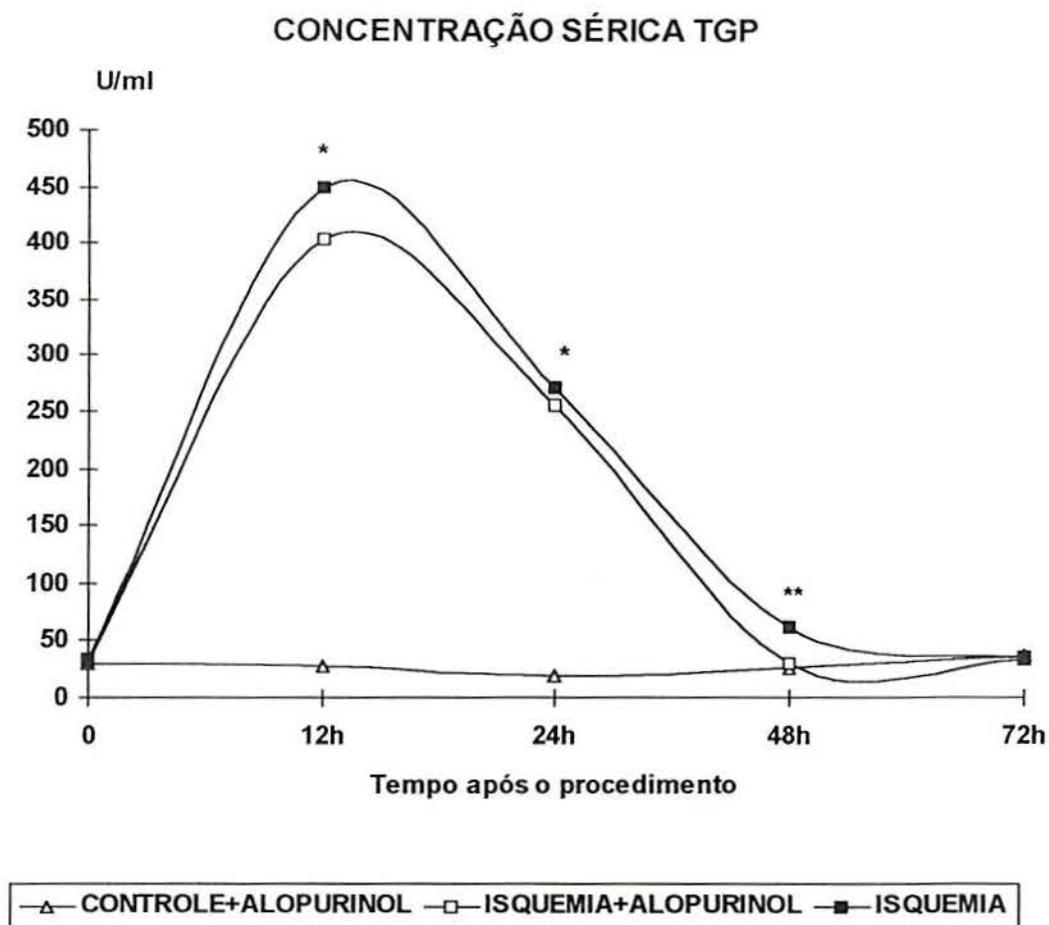


Gráfico 5- Representação gráfica das variações nas concentrações séricas da transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT, TGP) após procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão hepática em ratos tratados, e não, com alopurinol.

* Diferença estatisticamente significativa quando comparados os Grupos II e III com o Grupo I ($p < 0.05$). ** Diferença estatisticamente significativa quando comparados o Grupo III com os Grupos I e II ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II- Isquemia hepática e alopurinol, Grupo III-Isquemia hepática.

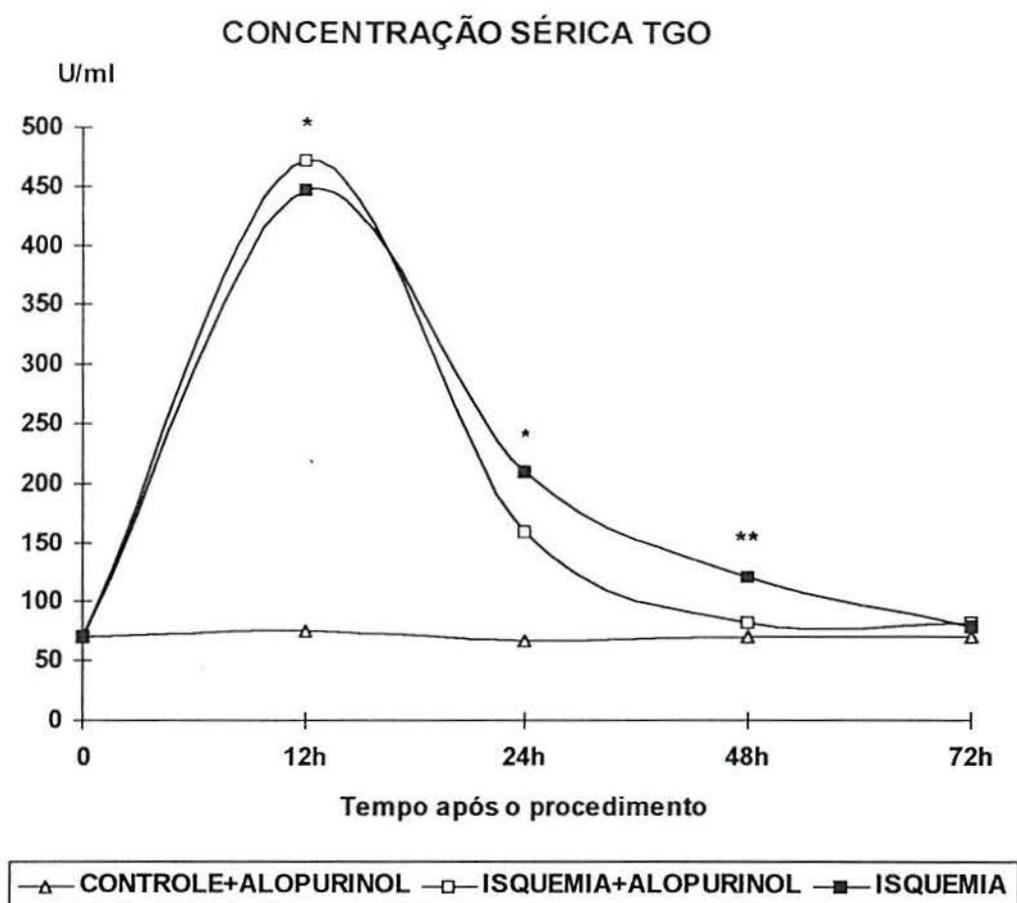


Gráfico 6- Representação gráfica das variações nas concentrações séricas da transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) após procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão hepática em ratos tratados, e não, com alopurinol.

* Diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos II e III com o Grupo I ($p < 0.05$). ** Diferença estatisticamente significativa quando comparado o Grupo III com os Grupos I e II ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II- Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol, Grupo III-Isquemia hepática de 45 minutos.

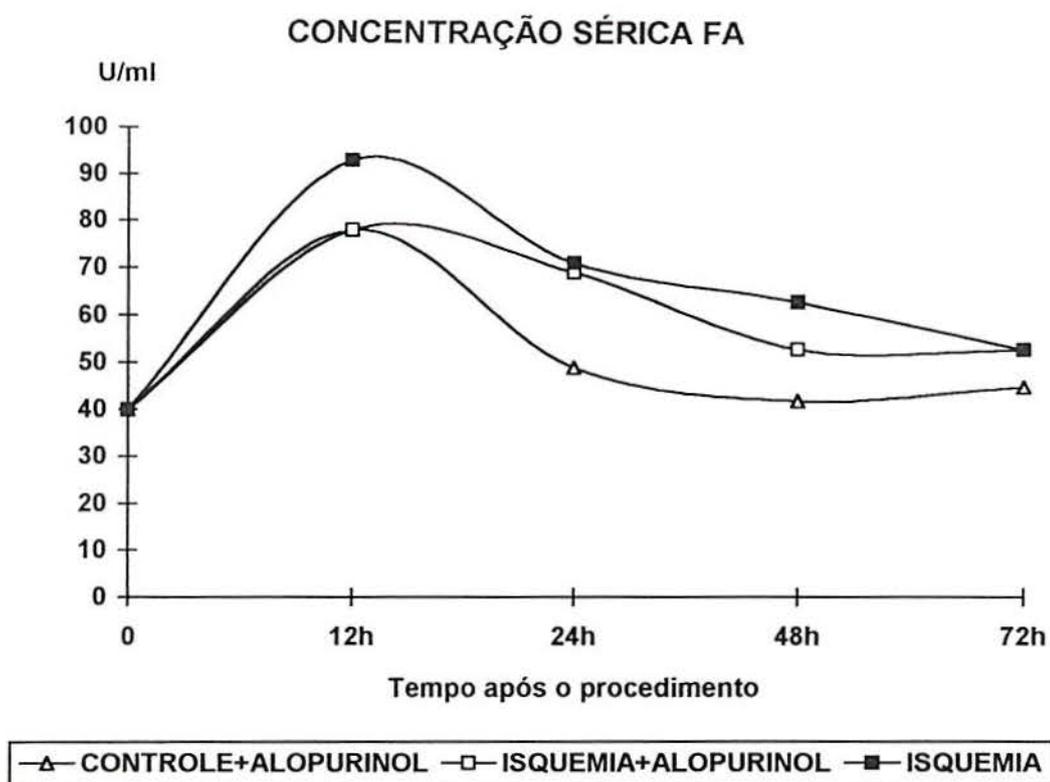


Gráfico 7- Representação gráfica das variações nas concentrações séricas da fosfatase alcalina (FA) após procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão hepática em ratos tratados, e não, com alopurinol.

* Análise de Variância (ANOVA), seguida do Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II-Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol, Grupo III- Isquemia de 45 minutos.

4.4 EXPERIMENTO 4: Determinação da lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, pré-tratados e não com alopurinol.

Observou-se pelo método do TBARS que os níveis teciduais de malondialdeído estavam significativamente superiores no Grupo III(Isquemia) em relação aos Grupos I e II (controle e isquemia e alopurinol)($p < 0.05$). A diferença entre os Grupos I e II não foi estatisticamente significativa($p > 0.05$). Pelo método da QL, observou-se que a energia luminosa emitida por carbonilas excitadas foi significativamente($p < 0.05$) superior no Grupo III quando comparada com aquela observada nos Grupos I e II e além disso, a diferença não foi significativa entre aquela observada entes dois grupos ($p > 0.05$).

Os dados estão expressos nas tabelas 9 e 10 e no Gráfico 8.

TABELA 9. Efeitos da isquemia e reperfusão hepática sobre a formação de malondialdeído tecidual em ratos tratados ou não com alopurinol.

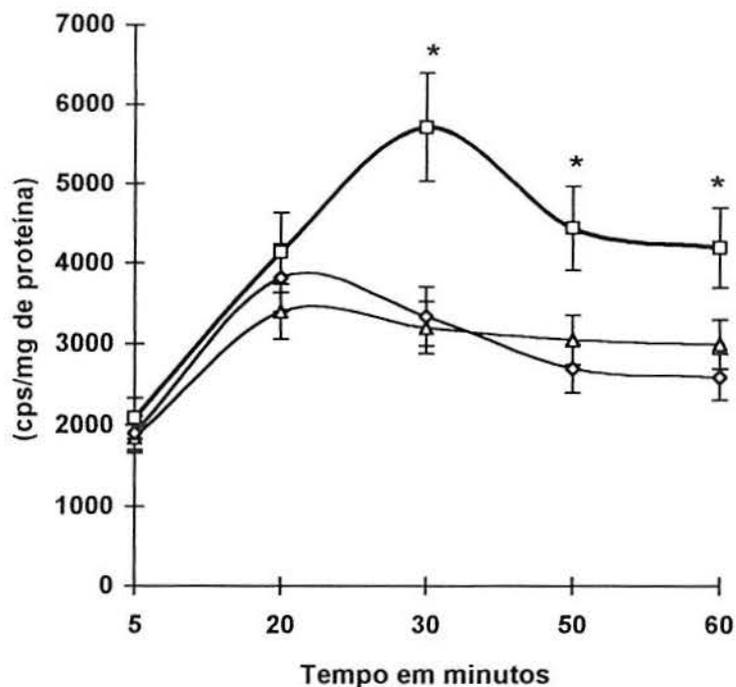
	TBARS (nmol/mg proteína)±SD
Grupo I	0,158 ± 0,019
Grupo II	0,165± 0,021
Grupo III	0,285 ± 0,022*
	118,89
$F_{(5\%,29)}$	

*Diferença estatisticamente significativa quando comparado o Grupo III com os grupos I e II($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II-Isquemia de 45 minutos e reperfusão de 1 hora e alopurinol, Grupo III- Isquemia de 45 minutos e reperfusão de 1 hora.

TABELA 10. Efeitos da isquemia e reperfusão hepática sobre a energia luminosa emitida por carbonilas excitadas, avaliado pela QL, em ratos tratados ou não com alopurinol.

	QLmáx. (cps/mg proteína)±SD
Grupo I	3708 ± 586
Grupo II	4097 ± 678
Grupo III	6057 ± 376*
F _(5%,29)	50,35

*Diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo III com os grupos I e II. Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I - Controle, Grupo II-Isquemia hepática de 45 minutos e reperfusão de 1 hora e alopurinol, Grupo III - Isquemia hepática de 45 minutos e reperfusão de 1 hora.



—△— I: RATOS CONTROLE —□— II: RATOS ISQUEMIA —○— III: RATOS ISQUEMIA + ALOPURINOL

Gráfico 8- Representação gráfica do perfil cinético da quimiluminescência (QL), iniciada por hidroperóxido de tert-butil, em tecidos hepáticos de ratos, tratados e não com alopurinol e, submetidos a isquemia e reperfusão do fígado.

*Diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo III com os grupos I e II ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Bonferroni ($p < 0.05$). Grupo I- Controle, Grupo II- Isquemia hepática de 45 minutos, reperfusão de 1 hora tratados com alopurinol, Grupo III-Isquemia hepática de 45 minutos e reperfusão de 1 hora,

4.5 EXPERIMENTO 5: Avaliar a taxa de mortalidade de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol.

Nos animais deste experimento avaliou-se a mortalidade pós-operatória decorrentes do procedimento cirúrgico. Entre os animais do Grupo I (Controle) não foram observados óbitos, entretanto, naqueles do Grupo II e III as mortalidades globais foram respectivamente 20 e 46.7%, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa, apenas, entre a mortalidade observada no Grupo 3 em relação ao controle ($p < 0.05$). A maioria dos óbitos ocorrem nas primeiras 24 horas após o procedimento 13.3 e 40% entre os grupos 2 e 3, respectivamente.

Tabela 11 - Mortalidade pós-operatória de ratos controle e ratos submetidos isquemia hepática tratados ou não com alopurinol.

	24h n %	48h n %	72h n %	96h n %
Grupo 1: Controle(n=10)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
Grupo 2: I+A (n=15)	2 (13.3)	1 (6.67)	- (0)	- (0)
Grupo 3: I (n=15)	6 (40)*	1 (6.67)	- (0)	- (0)
$\chi^2_{(5%;39)}$	6,667	0,702	não faz	não faz
	p=0,036	p=0,704		

*Diferença estatisticamente significativa do Grupo III quando comparado com o Grupo I ($p < 0.05$). Grupo I- Controle, Grupo II- Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol no pré-operatório, Grupo III-Isquemia hepática de 45 minutos. Teste do Qui-quadrado para um nível de significância de 95%.

4.6 EXPERIMENTO 6: Estudo das alterações histopatológicas dos fígados de ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados e não com alopurinol , em diferentes períodos do pós-operatório

O estudo histopatológico em diferentes períodos de pós-operatório demonstrou uma maior congestão vascular (Cv) (sinusoidal, centrolobular e espaço porta), na avaliação das 24 horas após o procedimento, naqueles animais dos grupos 2 e 3 quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0.05$). Além disso, a necrose hepatocitária, neste mesmo período, foi igualmente mais pronunciada nos animais dos grupos submetidos a isquemia (grupos 2 e 3) quando comparados aos animais nos quais este procedimento não foi efetuado (grupo 1) ($p < 0.05$). Observou-se também que aqueles animais que receberam pré-tratamento com alopurinol (grupo 2) apresentavam um grau de necrose menor do que aqueles nos quais esta droga não foi utilizada (grupo 3) ($p < 0.05$). A avaliação histopatológica efetuada 48 horas após o procedimento demonstrava ainda uma maior congestão vascular nos animais do grupo 2 em relação ao controle ($p < 0.05$) e, também, a necrose hepatocitária nos animais dos grupos 2 e 3 permaneceu mais pronunciada do que a observada no grupo controle (grupo 1) ($p < 0.05$), entretanto, não foi significativamente distinta a avaliação entre os grupos 2 e 3 ($p > 0.05$). As avaliações posteriores não demonstraram uma variação significativa entre os distintos grupos de

animais ($p > 0.05$). Além disso, a esteatose não foi característica observada durante a avaliação.

Tabela 12: Estudo histopatológico em diferentes períodos de tempo pós-operatório de ratos controle e ratos submetidos isquemia hepática tratados ou não com alopurinol.

	24h			48h			72h			96h		
	Cv	N	E	Cv	N	E	Cv	N	E	Cv	N	E
Grupo 1: Controle	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Grupo 2: I+A	3*	2*	0	2 ⁺	2*	0	1	0	0	1	0	0
Grupo 3: I	3*	3* ^o	0	1	3*	0	1	0	0	1	0	0
F (5%; 13)	7.7	10.0	0.0	10.2	7.3	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	6.9	0.0

n=20 Cv: Congestão vascular (sinusoidal, centrolobular, espaço porta); N: Necrose; E:Esteatose

Diferença estatisticamente significativa quando comparados os Grupos:

* 2 e 3 em relação ao 1.

^o 3 em relação ao 2

⁺ 2 em relação ao 1.

Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II-Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol, Grupo III- Isquemia hepática de 45 minutos.

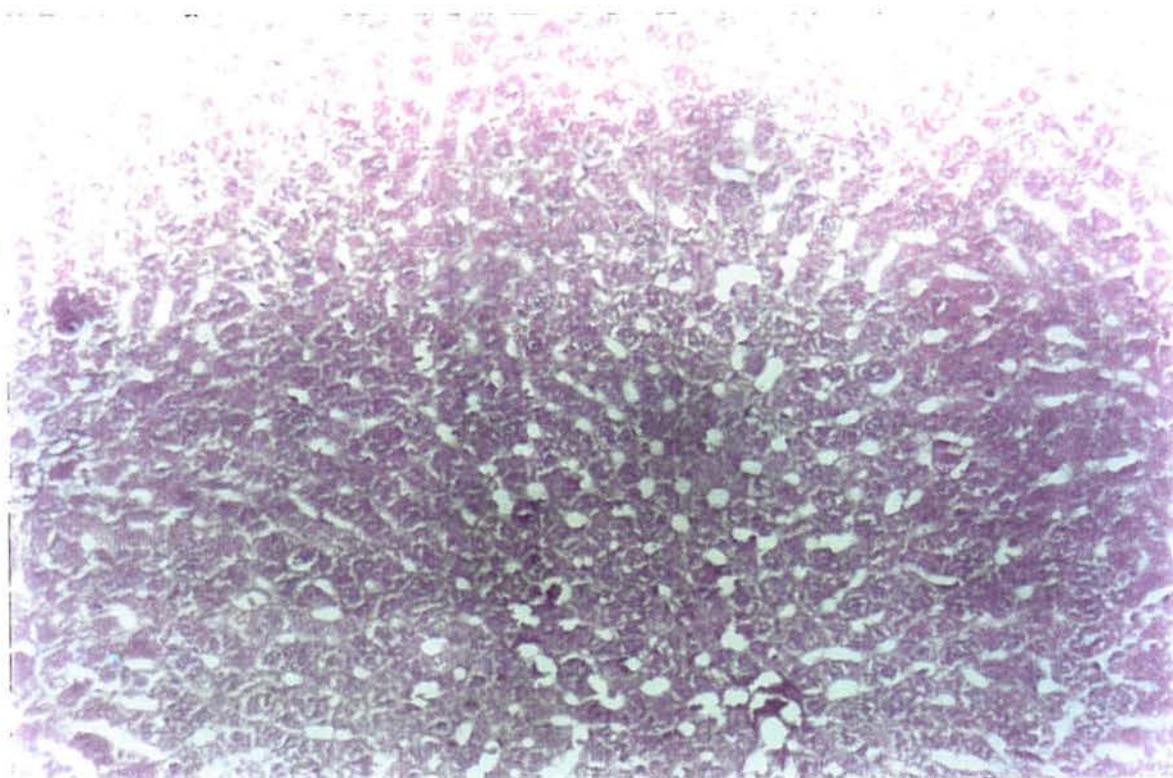


Figura 13 - Aspecto histopatológico de um fígado de rato normal (Hematoxilina Eosina) (80 aumentos).

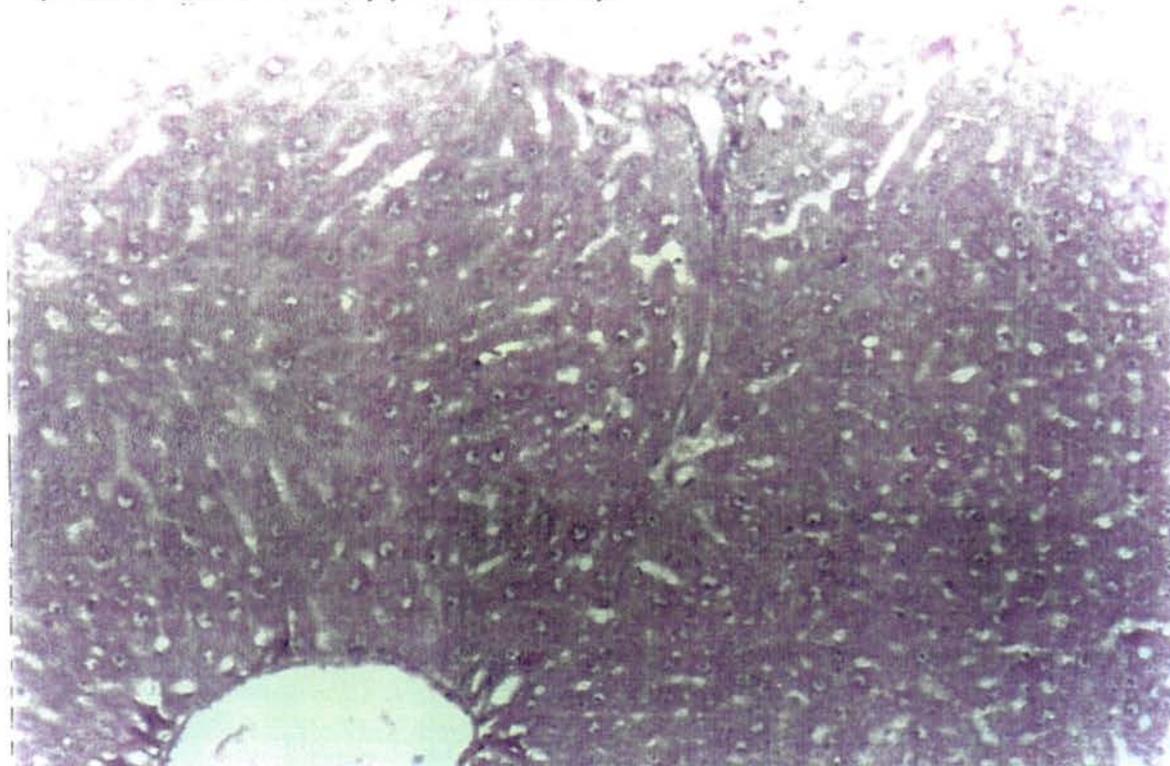


Figura 14 - Aspecto histopatológico de um fígado de rato normal (Hematoxilina Eosina) (100 aumentos).

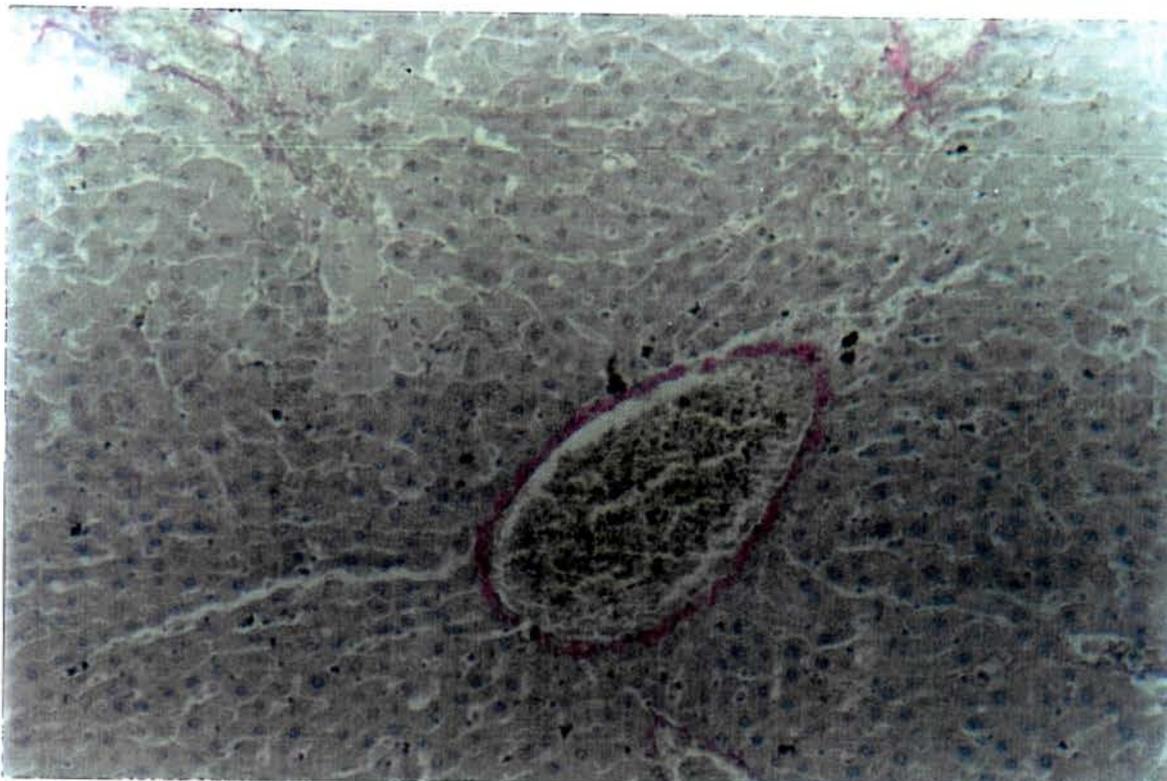


Figura 15-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 24 horas após isquemia onde pode-se observar a presença de congestão ao nível da veia centrolobular (Picrocilium) (100 aumentos).

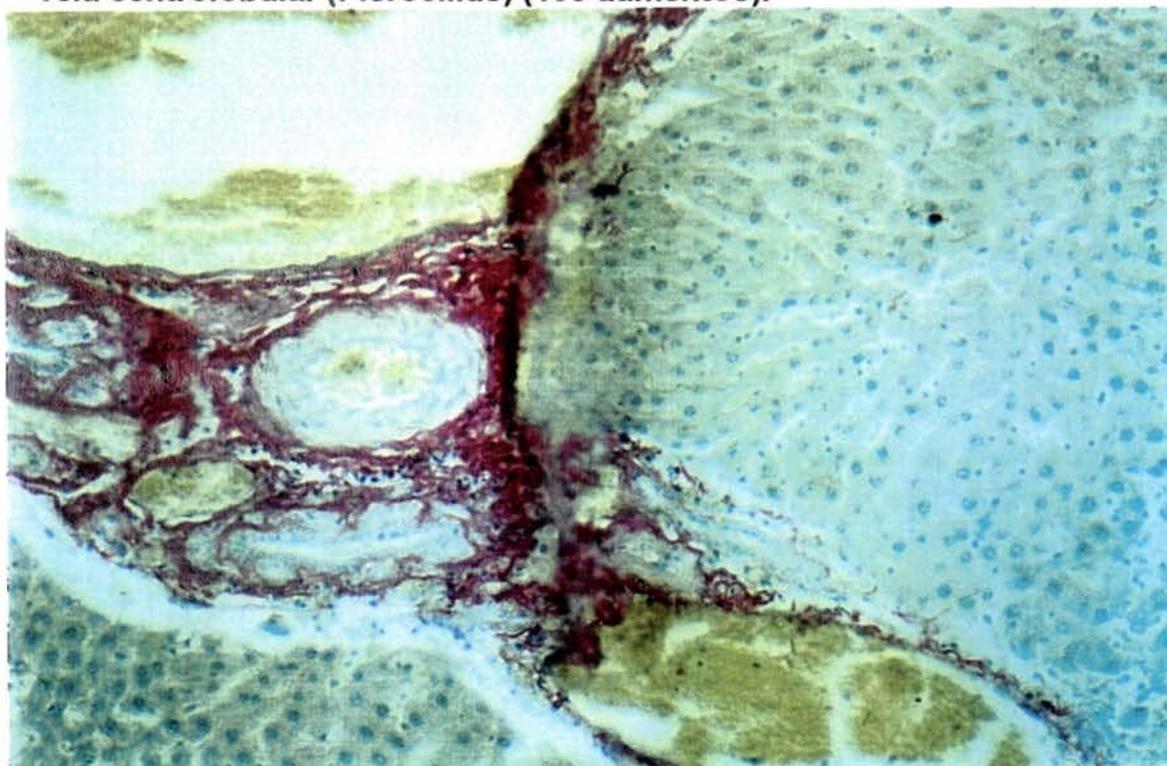


Figura 16-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 24 horas após a isquemia onde pode-se observar a presença de congestão ao nível do espaço porta (Picrocilium) (200 aumentos).

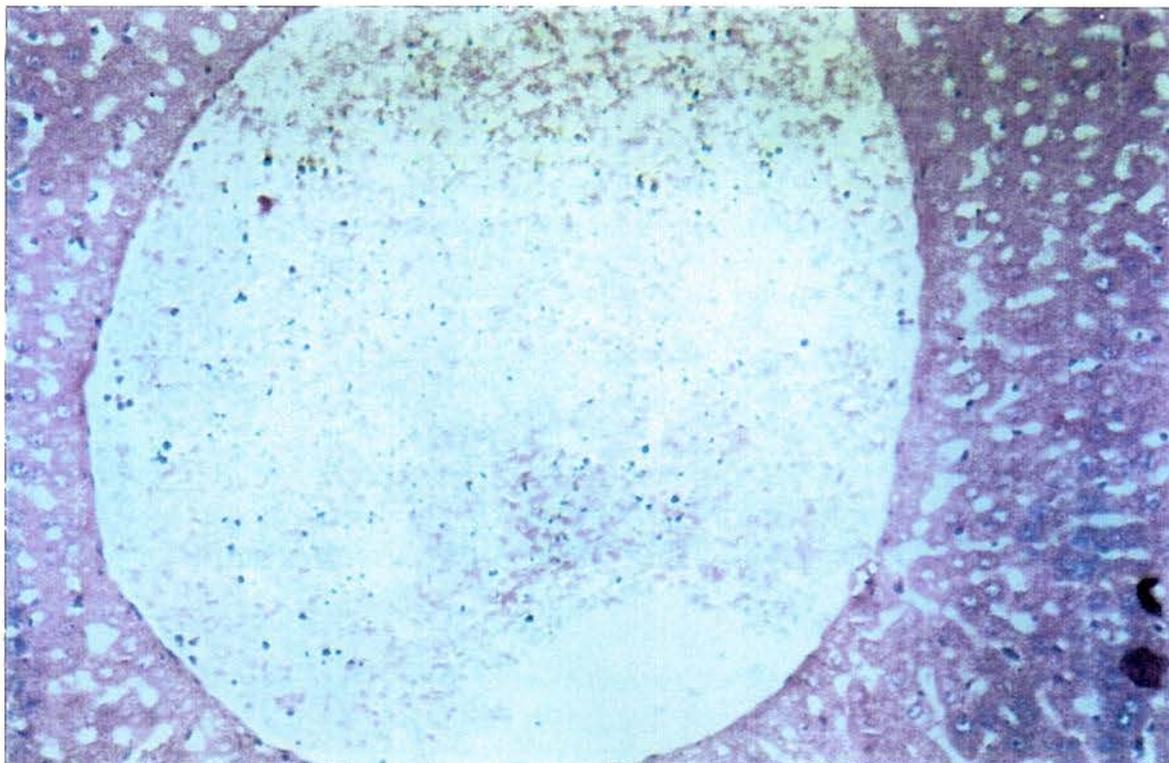


Figura 17-Aspecto histopatológico de fígado de rato 24 h após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar a presença de congestão da veia centrolobular (Hematoxilina-eosina) (200 aumentos).

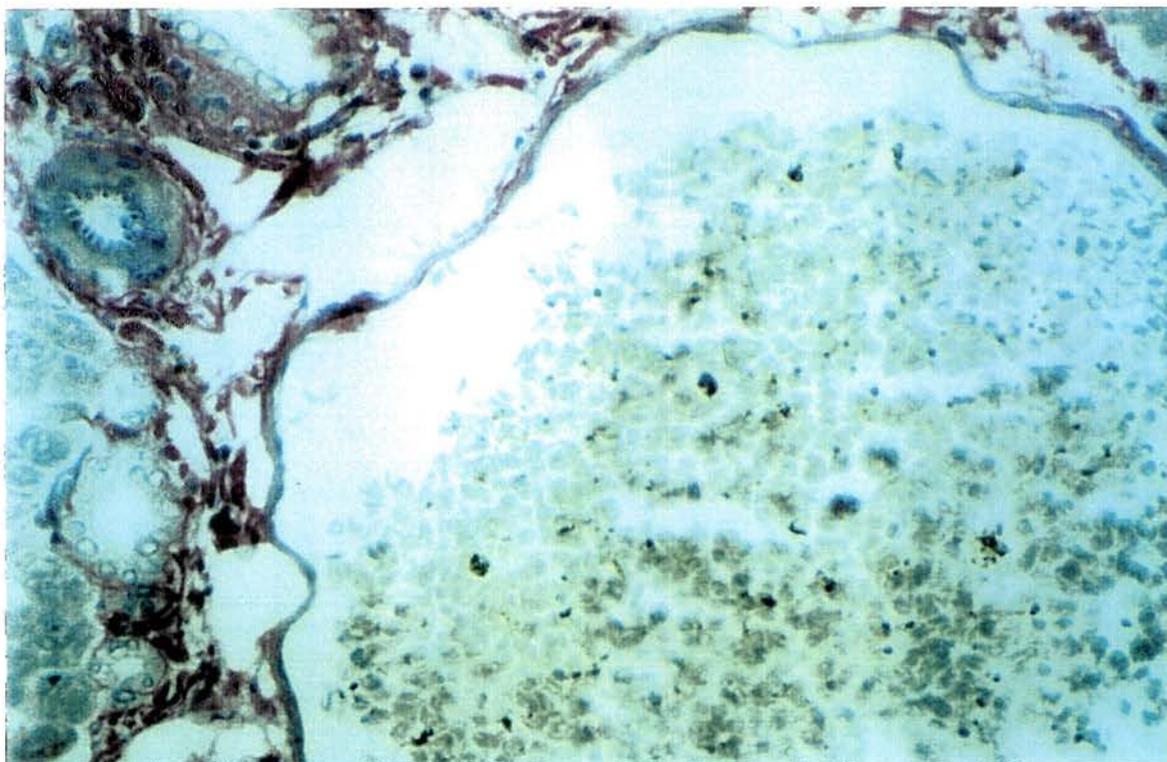


Figura 18-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 24h após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar congestão ao nível do espaço porta (Picrocilios) (200 aumentos).

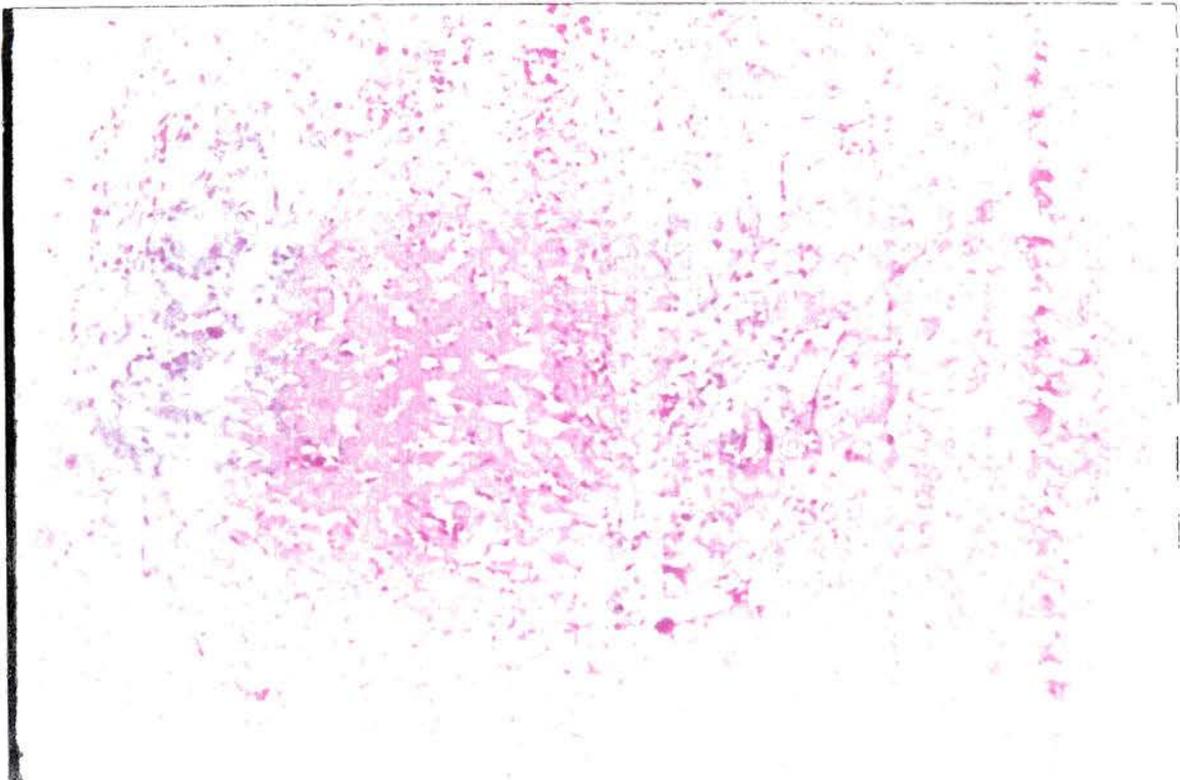


Figura 19-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 48 horas após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (100 aumentos).

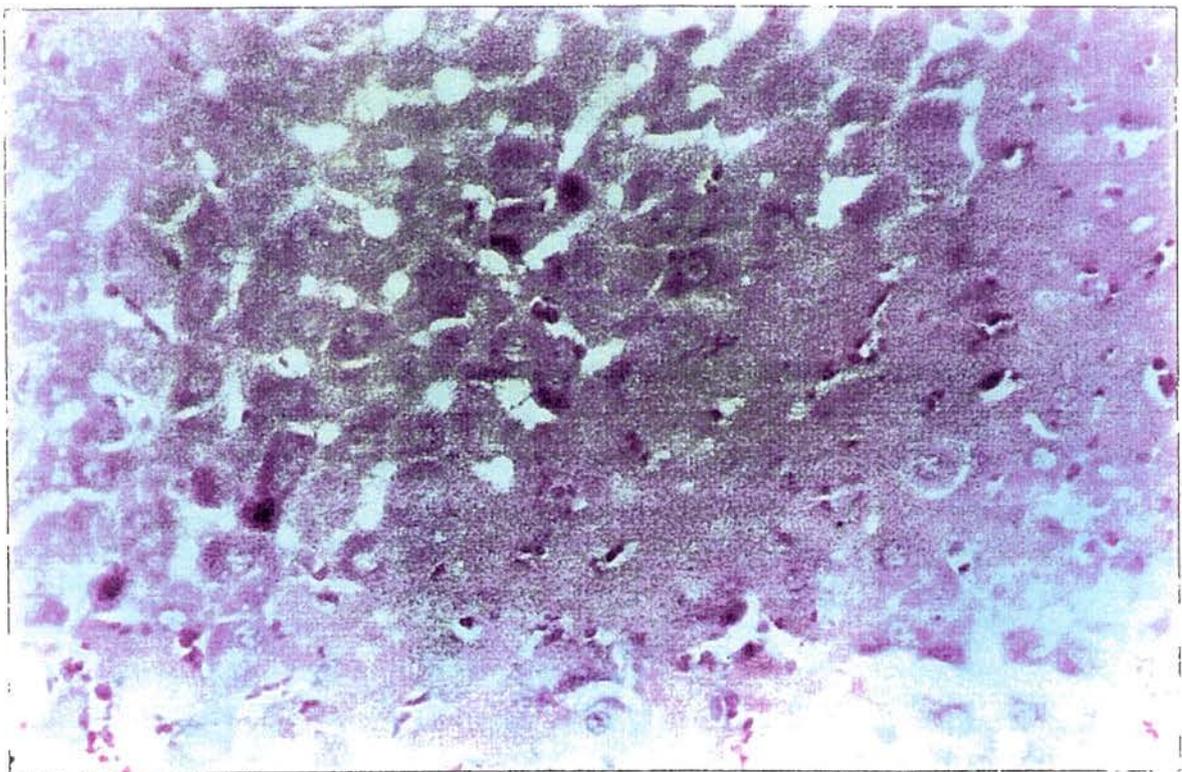


Figura 20-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 48 horas após isquemia e pré-tratamento com alopurinol onde se pode observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (200 aumentos).

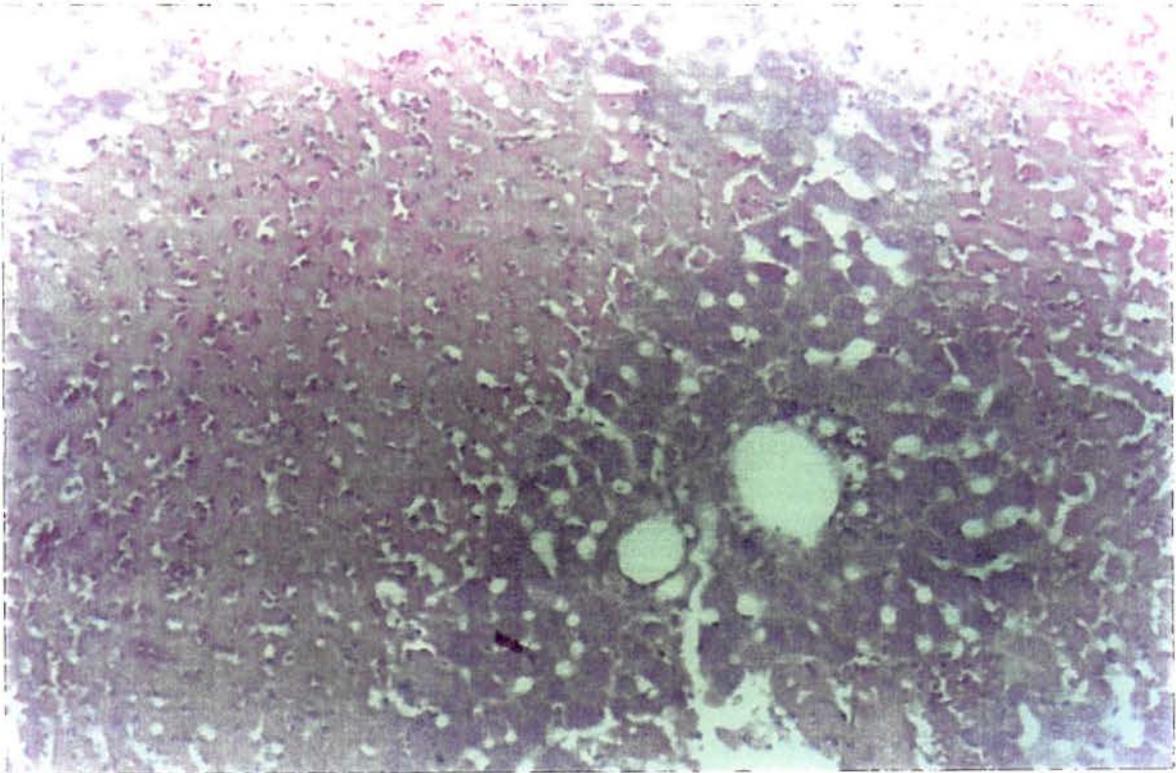


Figura 21-Aspecto histopatológico de um fígado de rato 48 horas após isquemia onde pode-se observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (100 aumentos).

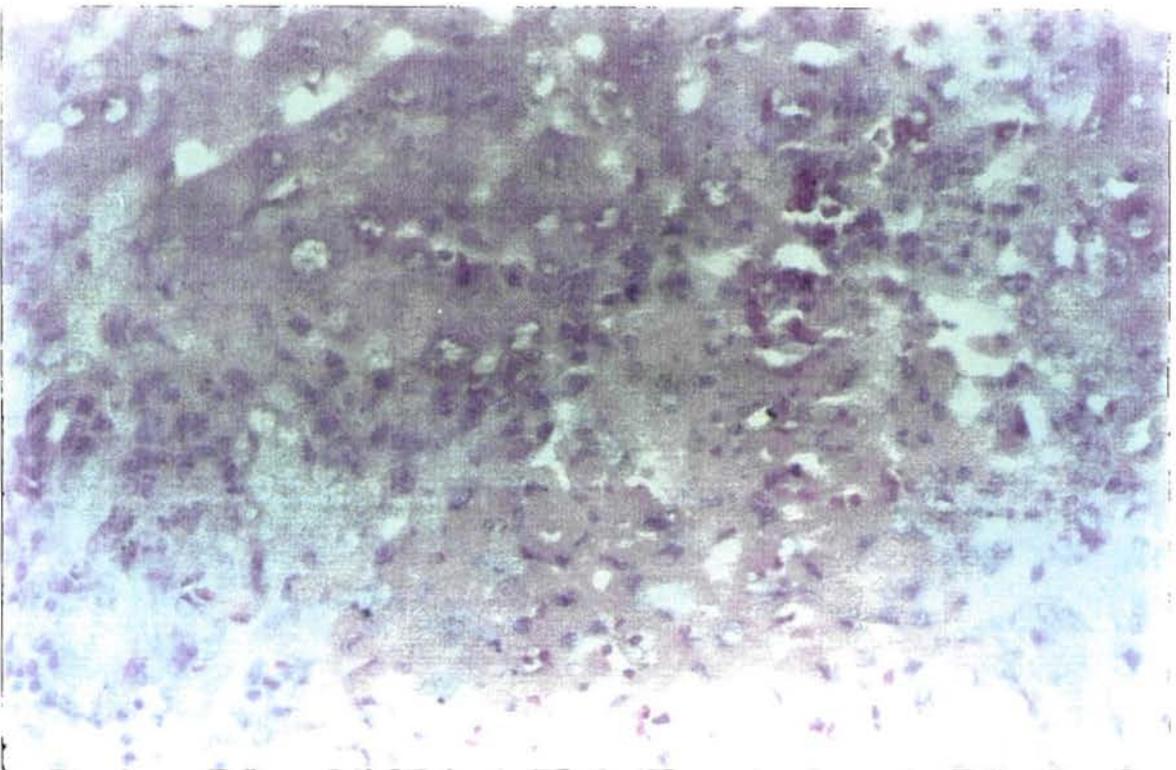


Figura 22-Aspecto histopatológico de fígado de rato 48 horas após isquemia onde pode-se observar a presença de necrose hepática (Hematoxilina Eosina) (200 aumentos).

5. DISCUSSÃO

A isquemia transitória hepática, muitas vezes requerida em procedimentos cirúrgicos sobre o fígado, seja para limitar as perdas sangüíneas ou quando a mesma se torna obrigatória (transplantes), tem sido cada vez mais amplamente utilizada (IMAMURA et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; IMAMURA et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; XIA et al., 1996). Contudo, esta atitude, embora muitas vezes benéfica, é contrabalançada pelos efeitos adversos advindos da isquemia hepática e da congestão esplâcnica, assim como, das conseqüências da reperfusão, recentemente considerada significativamente deletéria e, muitas vezes, com sérias repercussões funcionais (HUGET et al., 1978; SUC et al., 1992; ISOZAKI et al., 1992).

A interrupção intermitente do fluxo sanguíneo arterial ao fígado e os recentes conhecimentos advindos, principalmente, de estudos experimentais com animais, elucidando algumas rotas metabólicas envolvidas no dano hepático e, a possibilidade de interferir

farmacologicamente nas mesmas com o intuito de reduzi-lo e, portanto, melhorar a tolerância a períodos de isquemia tem sido propostos ((ISOZAKI et al., 1992).

Entre estas, o clampeamento seletivo, em hepatectomias, impede alterações hemodinâmicas sistêmicas severas, decorrentes principalmente da estase sangüínea porto-esplâcnica, assim como, evita a isquemia da porção remanescente do órgão.

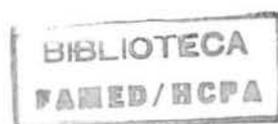
A reperfusão sangüínea que se segue ao período isquêmico tem recebido cada vez mais atenção como fator potencial de dano ao órgão, pela possibilidade de gerar a formação de EAO, elementos radicais extremamente reativos com capacidade oxidativa e destruição das membranas fosfolipídicas celulares. Na realidade, tem sido proposto que o período reperfusional é tão ou mais deletério ao(s) órgão(s) submetidos a isquemia, do que esta propriamente (ISOZAKI et al., 1992).

As EAO agem em nível celular consumindo os elementos antioxidantes lipossolúveis (homólogos da Coenzima Q10, alfa-tocoferol) e hidrossolúveis (glutationa, catalase), endógenos, durante o período reperfusional, sobrecarregando a atividade de enzimas detoxificadoras endógenas, como a superóxido dismutase e catalase, podendo, portanto, levar a oxidação dos componentes lipídicos das membranas celulares,

quando estas excedem a sua capacidade de neutralização (MARUBAYASHI et al., 1991).

Nas situações de isquemia e reperfusão o mecanismo mais destacado como responsável pela geração de EAO tem sido relacionado à enzima xantina oxidase (PALLER et al., 1984; CHEUNG et al., 1986; CROSS et al., 1987; COHEN, 1992; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995; WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; BACH et al., 1996).

Os mecanismos envolvidos na produção das EAO são decorrentes de uma série de alterações que se processam em nível celular. Assim, na ausência de oxigênio e conseqüente redução do nível energético, as células perdem a capacidade de manter os gradientes iônicos e acúmulos substanciais de cálcio intracelular podem ocorrer (PALLER et al., 1984; CHEUNG et al., 1986; CROSS et al., 1987; COHEN, 1992; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995; WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; BACH et al., 1996). Os níveis de cálcio citosólico são mantidos dentro de concentrações bastante estreitas, em função da atividade da bomba de cálcio, ao nível da membrana plasmática, deslocar para o exterior da célula este íon (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). A perda funcional da bomba de cálcio, durante o período isquêmico, permite que concentrações significativas deste íon aumentem no meio intracelular, com a conseqüente ativação de deletérios sistemas metabólicos (CHAVEZ-CARTAYA et al.,



1996). Assim, por exemplo, altas concentrações de cálcio citosólico podem ativar fosfolipases cálcio dependentes, resultando em quebras na membrana celular, produção de ácidos graxos e lisofosfolipases tóxicas as células (McCORD,1985; CHEUNG et al.,1986; COHEN, 1992; STEIN et al.,1993; ABROSIO et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al.,1996). Proteases, nucleases, glicogênio fosforilase, adenilato ciclase, sódio-potássio ATPase são reguladas pelo cálcio e, aumentos intracelulares de sua concentração aumentará a atividade da ATPase, desacoplando a fosforilização oxidativa com conseqüente depleção e menor produção de energia (McCORD,1985; CHEUNG et al.,1986; CROSS et al.,1987; COHEN,1992; WILLET et al.,1995; BACH et al.,1996).

NICOLLI et al.,1995, em recente estudo com mitocôndrias isoladas demonstraram a existência de canais nestas organelas, importantes na manutenção do potencial transmembrana, fundamental na geração energética da organela. Além disso, referem que a despolarização mitocondrial pela isquemia causa aumento do cálcio intramitocondrial e, a geração de peróxidos e radicais livres (reperfusão) mantêm estes canais permanentemente abertos com danos irreversíveis para a atividade funcional desta organela.

Portanto, poderia se supor que a elevação incontrolada do cálcio citosólico em tecidos isquêmicos, desencadearia uma cascata de eventos

lesivos a célula, constituindo causa principal de morte celular (TAKEMOTO et al.,1994). Entretanto, esta hipótese não é totalmente verdadeira, pelo fato de não haver uma correlação consistente entre o cálcio livre e o conteúdo total do mesmo, uma vez que muitos sítios e ânions são capazes de se ligar e seqüestrar este eletrólito, além do que, as mitocôndrias, mesmo lesadas, são capazes de acumular este íon enquanto houver oxigênio e substratos. Além disso, não existe um consenso sobre o momento no qual uma célula isquêmica está irreversivelmente danificada, assim como, a concentração de cálcio em células mortas ou lesadas, apresenta-se desuniforme em estudos histopatológicos (CHEUNG et al.,1986).

Entretanto, aspecto concreto é a ocorrência do incremento de cálcio citosólico em células isquêmicas, mas não é prova suficiente ou inequívoca do seu envolvimento como mediador irreversível do dano celular. Talvez a sua relação como potencializador e participante de outros mecanismos lesivos seja o seu papel principal (CHEUNG et al.,1986; HASSELGREN,1987; TAKEMOTO et al.,1994).

Portanto, a atenção para o envolvimento de outros fatores como potenciais causadores de dano celular, em situações de isquemia e reperfusão, tem sido pesquisados e, entre estes, as EAO são os mais destacadas por distintos autores (GRANGER et al.,1981; HANSSON et al.,1982; BULKEY, 1983; McCORD, 1985; HASSELGREN,1987; CROSS et

al.,1987; GALAT et al.,1990; COHEN,1992; TAKEMOTO et al.,1994; ORTOLANI et al.,1995; ORTOLANI et al.,1995; LOPEZ-NEBLINA et al.,1996).

A partir do entendimento da estrutura celular do ponto de vista morfológico e funcional, torna mais fácil a compreensão de eventos que se sucedem no dano imposto pela isquemia e, subseqüentemente, o da reperfusão, pela formação das EAO. É sabido que delgadas membranas lipoproteicas envolvem a célula (membrana celular) o citoplasma (membrana citoplasmática) o núcleo (membrana nuclear) e as diferentes organelas intracitoplasmáticas, com o objetivo de manter a arquitetura celular e os processos metabólicos que dependem da integridade das mesmas (MAYES,1980; GUYTON,1991; LEHNINGER et al., 1995). São denominadas membranas lipoproteicas porque apresentam na sua constituição uma dupla camada formada por lipídeos e, mergulhadas no seu interior, encontram-se moléculas protéicas (GUYTON,1991; LEHNINGER, 1995).

Desta maneira os lipídeos constituem uma barreira que impede o livre movimento da água de um compartimento celular para outro, enquanto as moléculas protéicas, interrompem esta barreira proporcionando assim vias de passagem para várias substâncias, além de exercer funções enzimáticas

essenciais a vida celular (MAYES, 1980 ; GUYTON, 1991; LEHNINGER,1995).

Além da estrutura individualizada e bem definida de cada unidade celular, vários processos metabólicos ocorrem tanto para manter a arquitetura celular, assim como, a atividade funcional específica da célula em determinado órgão (MAYES, 1980; LEHNINGER,1995).

Além disso, a célula para executar as suas funções depende de energia , fundamentalmente sob forma de adenosina trifosfatada (ATP) e, diversos mecanismos metabólicos estão envolvidos no processo de geração desta (GUYTON,1991; LEHNINGER,1995). O ATP é uma combinação de adenina, ribose e três radicais fosfato sendo os dois últimos radicais ligados ao restante da molécula através de conexões altamente energéticas. Após a perda de um radical fosfato do ATP, o composto torna-se adenosina difosfatada (ADP) e, após a perda do segundo radical fosfato o mesmo passa a ser adenosina monofosfatada (AMP), situações que ocorrem continuamente durante a atividade metabólica da célula, envolvido na execução de suas funções específicas (GRANGER et al.,1981; LEHNINGER,1995).

Além disso, diferentes processos metabólicos como o ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs), ciclo das pentoses, fosforilação oxidativa, cadeia de

transporte de elétrons, entre outros, são importantes fontes geradoras de energia celular (LEHNINGER,1995).

A complexidade destes eventos em nível celular é extrema, envolvendo uma série bastante ampla de rotas metabólicas apenas para a geração de energia. O oxigênio permeia praticamente todos os eventos funcionais que se processam em nível celular. (MAYES,1980; GUYTON,1991). Portanto, a formação contínua de EAO, pela combinação de átomos de oxigênio e hidrogênio, como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil ocorrem paralelamente. Entretanto, mecanismos de detoxificação destes elementos foram desenvolvidos pela célula, com o intuito de manter sua integridade e, conseqüentemente, a do órgão (BULKEY,1983; McCORD,1983; McCORD,1985). Esta relação e sucessão de eventos bioquímicos somente é mantida quando as condições fundamentais são preservadas, ou seja, a arquitetura celular e das membranas que envolvem as células e suas organelas, bem como, o contínuo suprimento de sangue e, por conseguinte, de nutrientes para o metabolismo celular (BULKEY 1983; McCORD, 1983; McCORD 1985).

O insuficiente suprimento sanguíneo ao fígado e por conseguinte às suas células, reduz rapidamente o nível de energia das mesmas levando conseqüentemente a falha em determinadas etapas do metabolismo com acúmulo de metabólitos nocivos às células (HANSSON et al., 1982;

BULKEY 1983; McCORD, 1983; HASSELGREN, 1987; CROSS et al., 1987; NICOLLI et al., 1995; ALEXANDER, 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; BACH et al., 1996). Assim, a interferência nos mecanismos responsáveis pela produção energética da célula, têm influências deletérias sobre a atividade funcional das mesmas, e a isquemia é o exemplo mais característico, causando distúrbios de graus variados em nível de função celular e subcelular, como a disfunção mitocondrial, alterações funcionais da membrana celular, assim como, na síntese de proteínas (HASSELGREN, 1987; CROSS et al., 1987; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

Os principais marcadores utilizados na quantificação do dano imposto pela isquemia e reperfusão hepática tem sido as transaminases oxalo-pirúvicas (ALT) e oxalo-acéticas (AST) e caracterizam-se por uma elevação substancial após qualquer injúria imposta ao fígado apresentando uma relativa proporcionalidade com o grau de agressão. Ocorre, nestas situações, o extravasamento destas enzimas para a circulação sanguínea (ISOZAKI et al., 1992).

No presente trabalho, onde avaliamos no EXPERIMENTO 1 as variações das transaminases e fosfatase alcalina em diferentes situações de dano hepático tendo em vista a observação da repercussão deste fenômeno em nível funcional do órgão. A análise do comportamento

das transaminases (AST e ALT) na isquemia intermitente, hepatectomia parcial ou associação de ambos os procedimentos demonstrou uma elevação súbita destas enzimas nas primeiras 48 horas após o evento, retornando gradativamente aos seus valores basais.

Além disso, é interessante observar que a soma dos valores das transaminases de cada uma das injúrias individualmente, seja pela isquemia ou hepatectomia isoladamente, equivalem-se estatisticamente a àquela advinda pelos dois procedimentos adotados no mesmo ato operatório (isquemia + hepatectomia), o que demonstra claramente o efeito aditivo advindo de cada um dos procedimentos isoladamente e, portanto, a observação de que a isquemia, muitas vezes requeridas em cirurgias hepáticas, não é isenta de efeitos adversos.

Além disso, uma maior elevação, proporcionalmente dos valores normais, das ALT em relação a AST é explicada pelo efeito agudo do dano imposto ao órgão. Por outro lado, a FA, demonstrou um comportamento algo distinto pela sua própria característica funcional, mantendo-se mais elevada ($p < 0,05$) durante todo período de observação com uma tendência a normalização no período final de observação. Estes aspectos foram também demonstrados por HIRASAWA et al., 1978, após 60 minutos de isquemia troncular total com derivação porto-femoral.

ISOZAKI et al., 1992, demonstrou achados semelhantes em relação a FA em seu experimento, no qual a isquemia foi o único dano imposto e, esta não se distinguiu significativamente dos grupos controles. Resultados semelhantes no que se refere a esta enzima foram encontrados por HIRASAWA et al., 1978, onde a FA não demonstrou variação significativa naqueles animais submetidos a isquemia isoladamente quando comparados aos animais do grupo controle o que sugere que não houve dano significativo ao sistema biliar em decorrência do procedimento.

A sua elevação relacionada a hepatectomia também é relacionável a atividade regenerativa, que se processou de modo mais significativa nos animais nos quais a ressecção hepática foi efetuada.

Como demonstrado, a isquemia está intimamente associada a lesão celular, entretanto, a quantificação, isoladamente, do efeito advindo da isquemia e aquele decorrente da reperfusão não é possível a partir do experimento em questão.

Com o objetivo de avaliar este efeito outros métodos laboratoriais são necessários entre estes destacam-se aqueles que demonstram a atividade oxidativa sobre os componentes lipídicos da membrana celular mediados, entre outros, pelas EAO. A interrupção do fornecimento de substratos para a produção de energia, que se segue a isquemia, necessária em várias

rotas metabólicas, faz com que as reservas celulares da mesma sejam mobilizadas através da degradação do ATP em ADP e a seguir em AMP, adenosina, inosina e então a hipoxantina, pela ação da adenase (CUNNINGHAM et al., 1974; GRANGER et al.,1981; McCORD,1983; PARKS et al.,1983; PALLER et al.,1984; McCORD,1985; HASSELGREN,1987; MENEGHINI,1987; ABROSIO et al., 1995; PRILLAMAN & TURNER,1997). Esta hipótese foi confirmada através de estudos em pacientes com miocárdios isquêmicos e em pacientes com choque hemorrágico nos quais concentrações elevadas de hipoxantina foram detectados (HANSSON et al.,1982; McCORD, 1985; ABROSIO et al.,1995).

MARUBAYASHI et al., 1991, observaram que em ratos, submetidos a isquemia hepática, a concentração tecidual de nucleotídeos adenínicos decresciam gradativamente enquanto a hipoxantina e xantina demonstravam uma elevação proporcional o que denota, claramente, a degradação da adenosina trifosfatada.

Associado a este fenômeno ocorre a elevação do cálcio citosólico, por mecanismos já expostos, que possuem a propriedade de ativar proteases capazes de converter a xantina deidrogenase tipo D em xantina oxidase tipo O, enzima ricamente distribuída nos tecidos como o intestinal, pulmonar, hepático e renal (GERSHMAN,1981; McCORD,1983;

SOUTHARD et al.,1987; NAUTA et al.,1990; MATIELI,1994; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al.,1995; PRILLAMAN & TURNER ,1997).

A reperfusão sangüínea fornecendo o oxigênio aos tecidos previamente isquêmicos, seria o substrato final para a ativação da xantina oxidase, através de uma oxidação sulfidrílica ou proteólise (GERSCHMAN, 1981; BULKEY,1983; McCORD,1985; GALAT et al.,1990). A ativação desta enzima teria como conseqüência a transformação da hipoxantina em xantina e agindo sobre esta formaria os uratos e as EAO (radical superóxido) (GERSCHMAN,1981; PARKS et al.,1983; PALLER et al.,1984; McCORD,1985; CROSS et al.,1987; KARWINSKI et al.,1993; PRILLAMAN & TURNER,1997).

As EAO, moléculas altamente reativas, em função de suas propriedades oxidativas podem agir diretamente sobre os componentes lipídicos das membranas celulares (GERSCHMAN, 1981; BULKEY,1983; PALLER et al.,1984). Este fenômeno também pode se processar indiretamente através de radicais lipídicos peroxidados, além de outros produtos da fragmentação lipídica que por si só são agentes oxidantes (BULKEY,1983; BELLÓ-KLEIN,1994).

Além disso, uma característica das EAO é a tendência de gerar reações em cadeia para produzir espécies radicais resultando em uma

amplificação do processo que culmina com um efeito destrutivo sobre a célula (BULKEY, 1983; MENEGHINI, 1987).

O dano celular pode se restringir a membrana celular propriamente dita, mas pode também, se estender as membranas das organelas, mitocôndriais e lisossômicas, cuja estrutura é bastante semelhante a da celular (MENEGHINI,1987; WILLET et al.,1995; NICOLLI et al.,1995). A ruptura lisossômica, com a conseqüente liberação de enzimas citotóxicas pode potencializar o dano celular induzido pelo radical livre (BULKEY,1983). As mitocôndrias são organelas envoltas por membranas que não são somente vulneráveis a tal ação mas, também, são uma contínua fonte de geração de EAO (BULKEY,1983; McCORD, 1985).

A repercussão dos fenômenos descritos podem ser avaliados através da sua interferência sobre a função do órgão, como demonstrado, assim como, pela determinação indireta de seus efeitos em nível de membranas celulares avaliados através da lipoperoxidação (oxidação lipídica) (MAYES,1980; LEHNINGER,1995).

O malondialdeído, produto da peroxidação dos ácidos graxos é a substância mais comumente adotada como marcador para avaliar a ação radical livre através do método do TBARS. Outras abordagens freqüentemente utilizadas são as medidas dos produtos da degradação da

adenosina trifosfatada, determinação tecidual dos anti-oxidantes, medida da atividade da enzima xantina oxidase, propriamente dito, bem como da sua precursora a xantina deidrogenase. Além disso, a concentração tecidual de nucleotídeos adenínicos e hipoxantina são freqüentemente adotadas (MARUBAYASHI et al., 1991; NUNES et al., 1995).

A instabilidade elétrica das EAO é o princípio fundamental sobre a qual reside a ação das mesmas. Tendo em vista que o potencial oxidativo é fundamentalmente decorrente da reatividade (desemparelhamento de elétrons da camada mais externa) das EAO quando estas interagem com os componentes da membrana celular. Esta reação tem como objetivo o repouso elétrico das EAO, que se associa com a emissão de energia luminosa detectável por distintos métodos entre os quais a quimiluminescência (QL).

A QL tem sido utilizada como um método direto não-invasivo de mensuração da formação de EAO (NUNES et al., 1995). Durante a dismutação das EAO um grande número de produtos são excitados. As EAO emitem luz, quantificável, quando retornam ao seu estado fundamental de repouso. A medida direta, portanto, da intensidade de energia luminosa emitida permite inferir a intensidade de EAO formadas. Além disso, técnicas extremamente aperfeiçoadas como a ressonância spin eletrônica tem demonstrado a capacidade de mensuração da atividade radical livre.

Fica evidente no Experimento II, onde se pode observar que a isquemia (Grupo 2), por si só, não produz malondialdeído em quantidade substancial quando comparado com a concentração tecidual no tecido hepático normal (Grupo1).

Entretanto, a reperfusão e, por conseguinte a geração de EAO com potencial oxidativo sobre as membranas celulares, torna-se bastante evidente nos Grupos III e IV onde se permitiu a reoxigenação tecidual. Fica também claro que o processo reflete-se imediatamente após restabelecida a oxigenação e incrementos menores tendem a ocorrer, porém, em graus de intensidade bem menos substanciais, tendo em vista a ausência de uma diferença significativa nas concentrações teciduais do malondialdeído entre os períodos de 30 e 60 minutos de reperfusão.

No experimento 2, a QL confirma, ou melhor ratifica os resultados obtidos pelo método do TBARS, ou seja, a ausência de instabilidade reativa significativa das EAO presentes no Grupo II , ou seja, onde somente a isquemia foi praticada (não permitindo-se a reperfusão) quando comparada aos tecidos hepáticos de ratos normais. Estes aspectos tornam-se ainda mais evidentes quando se estudou os tecidos hepáticos nos quais a reperfusão foi permitida, mostrando uma elevação significativa da atividade energética após a reoxigenação. Também fica claro, e corrobora os

achados na avaliação pelo método do TBARS, que uma elevação substancial da atividade ocorre dentro dos 30 minutos iniciais, após o restabelecimento da reperfusão, e elevações menos substanciais ocorrem após, haja visto a ausência de uma distinção ($p > 0,05$) da atividade energética (QL), bem como, do produto de sua reação, o malondialdeído (TBARS), após 30 ou 60 minutos do restabelecimento da circulação sangüínea.

Estudos realizados por diversos autores (PRILLAMAN & TURNER, 1977; OHKAWA et al., 1979; GRANGER et al., 1981; PARKS et al., 1983; GONZALEZ-FLECHA et al., 1991; TAKAYAMA et al., 1994; KLAIN-BELLÓ, 1994; OREDSSON et al., 1995; ALEXANDER et al., 1995; ORTOLANI et al., 1995; IMAMURA et al., 1995; RHODEN et al., 1997; RHODEN et al., 1997), envolvendo a Síndrome isquemia e reperfusão em outros órgãos como fígado, cérebro, músculo esquelético, pulmão, intestino e rins, tem demonstrado resultados concordantes no que se refere a lipoperoxidação das membranas celulares das células dos respectivos órgãos, avaliados através dos métodos empregados no presente experimento, e a sua repercussão em nível de função do órgão em estudo, validando desta forma os mesmos como testes para quantificação da injúria decorrente nesta situação.

Portanto, envolvimento das EAO, entre outros mecanismos de injúria, tem sido amplamente reconhecido como deletérios na isquemia seguida de reperfusão. A abordagem deste fenômeno com o intuito de se interferir com o objetivo de reduzir os efeitos das mesmas consiste, basicamente, na prevenção da formação de EAO ou eliminação das mesmas imediatamente após a sua formação (PRILLAMAN & TURNER, 1997). Na primeira alternativa o uso de substâncias farmacológicas que interfiram em rotas metabólicas fundamentais de formação das EAO como o alopurinol (inibidor da xantina oxidase, enzima amplamente reconhecida como geradora da formação de espécies radicais) e os bloqueadores dos canais de cálcio (diminuindo a conversão da xantina deidrogenase em xantina oxidase) (PRILLAMAN & TURNER, 1997).

Uma outra estratégia consistiria em eliminar as EAO imediatamente após a sua formação, através de substâncias, normalmente existentes endogenamente, conhecidas como "scavengers" e entre as quais a catalase (converte as EAO em água), superóxido dismutase (SOD), vitamina E e glutathione são as mais destacadas (KARWINSKI et al., 1993; PRILLAMAN & TURNER, 1997). Na realidade, estas últimas, por existirem naturalmente, operam continuamente e em situações de estresse (reperfusão) são consumidas na tentativa de bloquear a ação radical livre e desta forma proteger as células e, sua suplementação poderia, portanto, ser benéfica (KARWINSKI et al., 1993).

Como demonstrado nos experimentos anteriores e também por outros autores a isquemia hepática causa severo dano celular sem levar a morte se não prolongada e, por outro lado, a reperfusão pode induzir a um estresse oxidativo com liberação de EAO (BENDINELLI et al., 1996; IMANISHI et al., 1996).

A xantina oxidase, enzima sobre a qual recaem as maiores evidências, como fonte principal de geração das EAO no tecido hepático, assim como em outros tecidos, foi o alvo sobre o qual dirigimos a atenção, tendo em vista a redução da ação das mesmas sobre o fígado através da análise da variação enzimática, lipoperoxidação e mortalidade pós-operatória. No que se refere a este último aspecto, o período de isquemia foi estendido, uma vez que nos experimentos anteriores, com isquemias intermitentes de curtos intervalos não causaram mortalidade, e esta parece estar intimamente relacionada com o tempo de isquemia e da congestão esplâncnica. Além disso, a congestão esplâncnica foi evitada pelo clampeamento seletivo, removendo-se um potencial fator de confusão. Esta atitude é simples e segura tendo em vista o arranjo do fígado de ratos em lobos separados com pedículos facilmente individualizáveis, permitindo uma satisfatória interrupção do fluxo sanguíneo para os lobos hepáticos desejados (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Este aspecto é de fundamental importância e claramente demonstrado nos estudos de

MACKENZIE et al., 1975 e 1977, no qual cães foram utilizados, sendo a isquemia máxima tolerável, de forma contínua e total, de 30 minutos. A mortalidade quase universal era observada quando períodos maiores de isquemia eram adotados, seja decorrente da isquemia propriamente dita ou da congestão esplâncnica.

Entretanto, é importante observar como demonstrado por LINAS et al.,1990, que o período de tempo necessário para a detecção de quantidades significativas de xantina oxidase após isquemia renal é de 30 minutos, o que justifica os períodos de tempo adotados. Estudos similares em outros órgãos como fígado, coração, intestino, músculo esquelético têm demonstrado resultados similares (PARKS et al.,1983; ZAGER & GMUR, 1989; GALAT et al.,1990; NAUTA et al.,1990; MARUBAYASHI et al.,1991; COHEN,1992; GREENE & PALLER1992; BELLÓ-KLEIN, 1994; GÜRKE et al., 1995; NUNES et al.,1995; DI LISA et al.,1995; FREDERIKS et al., 1995)

A avaliação restrita a um curto intervalo de tempo, primeiras 72 horas, é justificado pelos resultados dos experimentos anteriores, que demonstram o intervalo das 48 horas iniciais como sendo o mais significativo e no qual se processam as principais alterações.

O alopurinol, droga estudada no presente estudo, além da propriedade de inibir a enzima xantina oxidase, enzima considerada

fundamental na geração do radical superóxido, apresenta a propriedade de agir como "scavenger" de EAO, assim como em permitir a ressíntese do ATP pela maior preservação da hipoxantina (KARWINSKI et al., 1991). Entretanto, segundo NUNES et al., (1995), a inibição da enzima é o aspecto mais importante em sua ação protetora contra as EAO. Este aspecto é também reforçado no trabalho de CUNINGHAM et al., (1974), onde a concentração tecidual hepática de ATP, ADP e AMP foi inversamente relacionada com o tempo de isquemia e esta queda foi significativamente menor nos animais (ratos) que receberam alopurinol no período pré-isquêmico. Além disso, a ressíntese do ATP também foi maior entre estes últimos animais o que demonstra que a inibição da enzima xantina oxidase pode impedir a degradação dos metabólitos do ATP até situações de irreversibilidade.

Em relação a dose, no presente trabalho optamos por administrar 50 mg/kg por via intraperitoneal 5 horas antes da cirurgia pelo fato do alopurinol sofrer conversão em aloxantina aproximadamente 2 à 3 horas após a sua administração de acordo com estudos de farmacocinética com esta substância (INSEL, 1996).. Este último, é um metabólito extremamente ativo e de longa permanência tecidual, apresentando uma ação significativa sobre a enzima xantina oxidase, Além disso, administrou-se 50 mg/kg por via intraperitoneal da mesma substância 1 hora antes da indução da isquemia, com o intuito de aproveitar os efeitos do alopurinol, propriamente

dito e, não de seu metabólito apenas, no processo de inibição da xantina oxidase.

Substancial elevação nas transaminases (AST e ALT) foram observadas nas primeiras 48 horas após isquemia tanto no grupo que recebeu pré-tratamento com alopurinol como naqueles animais que não receberam esta substância, embora tendendo para uma elevação maior e mais prolongada no animais não pré-tratados com esta substância, porém sem uma distinção estatisticamente significativa, exceto na avaliação das 48 horas. A fosfatase alcalina não apresentou alterações entre os distintos grupos, reforçando os dados já obtidos anteriormente.

Resultados semelhantes aos do presente estudo também foram demonstrados por LEE e KIM ,1995, no qual um período de isquemia hepática de 60 minutos foi instituído em ratos, sendo os mesmos pré-tratados com alopurinol. Esta substância não apresentou um efeito significativo sobre as concentrações séricas da enzima ALT quando comparada com o grupo de animais que não receberam a referida droga.

O envolvimento de outros mecanismos como por exemplo as vias do óxido nítrico e do ácido araquidônico e provavelmente outros ainda não definidos devem exercer efeitos substanciais no fenômeno da isquemia e

reperfusão e que podem justificar os resultados obtidos no presente estudo assim como os de outros autores.

Além disso, é necessário considerarmos que as transaminases e a fosfatesemia não são propriamente provas de função hepática e talvez não sejam os parâmetros mais fidedignos para refletir o grau lesão hepática, como já observados por outros pesquisadores (LEE & KIM, 1995).

Estudos, em outros órgãos, como por exemplo os rins, desenvolvidos, elegantemente, por HANSSON et al., 1982, no qual coelhos tratados ou não com alopurinol e, submetidos a isquemia e reperfusão renal, demonstraram que as concentrações teciduais de hipoxantina cresceram progressivamente no tecido renal durante a fase isquêmica e, durante a reperfusão, as concentrações séricas da xantina se elevaram progressivamente, indicando a oxidação da hipoxantina, acumulada durante o período isquêmico, pela enzima xantinaoxidase como uma forma de comprovar o envolvimento desta enzima em etapas fundamentais que levam a formação das EAO.

Também, neste mesmo estudo, nos animais pré-tratados com alopurinol as concentrações séricas da xantina eram imensuráveis, mesmo após a reperfusão, indicando um total bloqueio da oxidação da hipoxantina e, por conseguinte, uma redução da produção das EAO (HANSSON et al., 1982). Além disso, neste mesmo estudo o alopurinol foi capaz de reduzir

a resistência ao fluxo sanguíneo intra-renal, medido através de um fluxômetro eletromagnético acoplado a artéria renal. Esta característica tem sido atribuída a menor geração de EAO e, conseqüentemente, uma menor lesão celular e, por conseguinte, um menor efluxo de plasma, mantendo desta forma o hematócrito mais reduzido do que naqueles nos quais uma maior lesão celular é determinada pelas EAO(PALLER et al., 1984).

Estudo interessante desenvolvido por RINALDI et al.,(1995), demonstrou que a solução de preservação de órgãos Wisconsin foi superior, em termos de resultados(rejeição, infecção e mortalidade), em transplantes de pulmão, à solução de Euro Collins, diferença esta atribuída principalmente à presença de alopurinol e glutathione na primeira, substâncias com ações anti-radical livre. Além disso, o uso do alopurinol previamente ao transplante renal em cães revelou efeitos significativamente benéficos em termos de sobrevida e função do órgão (TAKEMOTO et al.,1994).

MARZI al.,(1992), estudando o envolvimento das EAO na via do ácido araquidônico em transplantes hepáticos e o uso de soluções sem a presença de detoxificadores de radicais livres do oxigênio (Euro-Collins) e soluções que contêm estes elementos (University Wisconsin), principalmente o alopurinol e glutathione, indicou que a perfusão sinusoidal de leucócitos assim como a aderência permanente dos mesmos estava

significativamente mais reduzida naqueles nos quais a Solução de Wisconsin foi empregada. Estes dados suportam a hipótese do envolvimento das EAO na ativação leucocitária endotelial como potencial causadora de injúria celular.

Também em músculos esqueléticos submetidos a isquemia, em indivíduos pré-tratados com alopurinol, a preservação da força muscular e redução do índice de fadiga foi mais marcante do que naqueles nos quais esta substância não foi administrada (GÜRKE et al., 1995).

O efeito da reperfusão sobre as células caracteriza-se pela peroxidação dos componentes lipídicos das membranas celulares causada pela geração de EAO, quando o afluxo de oxigênio aos tecidos previamente isquêmicos é restaurada. A desestruturação da arquitetura celular neste processo leva por conseguinte a distúrbios funcionais do metabolismo celular seguido de morte celular e eventos decorrentes.

No presente estudo, interesse especial é direcionado ao fenômeno acima descrito e, a possibilidade de interferir neste, de modo a reduzir a injúria decorrente. Para tanto, o modelo de isquemia hepática seletiva foi utilizado por um período de 45 minutos seguido de um período de reperfusão de 60 minutos. Este último advindo dos resultados obtidos a

partir do EXPERIMENTO 2, que demonstrou ser este o intervalo de tempo onde um maior efeito do período reperfusional foi observado.

A peroxidação dos componentes lipídicos das membranas celulares dos hepatócitos, evidenciada no presente estudo, assim como nos de outros autores, incentiva a busca de atitudes que possam interferir neste processo e, por conseguinte, reduzir o dano decorrente.

Pelo método do TBARS, que quantifica o malondialdeído (OHKAWA et al.,1979; GONZALES-FLECHA et al.,1991), produto final da oxidação dos ácidos graxos (Tabela 9), como uma medida indireta da formação e ação de substâncias altamente reativas e oxidantes, pudemos observar, à semelhança do estudo desenvolvido por HANSSON et al., (1982) uma elevação significativa de malondialdeído, nos animais não tratados com alopurinol quando comparados com aqueles que receberam esta substância. Outro dado a ressaltar, e que confirma que o período reperfusional se associa e, é essencial na geração das espécies ativas oxidantes, é o fato de que naqueles animais nos quais não foi permitida a reperfusão, isto é, a concentração de malondialdeído foi equiparável ao do grupo controle e também não significativamente distinta da daqueles animais que receberam pré-tratamento com o alopurinol.

Dados que respaldam os resultados encontrados pelo método do TBARS são aqueles obtidos pelo método da QL. É fundamental a concordância de ambos os métodos na validação dos resultados, tendo em vista a avaliação do mesmo fenômeno porém visto sob aspectos distintos.

Na avaliação direta da atividade energética das EAO pelo método da QL, que quantifica a energia luminosa emitida pelas carbonilas excitadas quando as mesmas, formadas no período reperfusional, retornam ao seu estado fundamental, ou seja, de repouso, após um período de intensa reatividade, mostrou uma maior intensidade da mesma naqueles animais que não receberam previamente o alopurinol quando comparados com os ratos que receberam esta substância e, também, em relação aos grupos controles (Tabela 10). Estes dados denotam uma concordância fundamental entre ambos os métodos utilizados no presente experimento, ou seja, a ocorrência maior de oxidação de ácidos graxos, detectados pela formação de malondialdeído, pelo método do TBARS e, por outro lado, uma maior emissão de energia luminosa, por espécies ativas altamente reativas, pela quimiluminescência, em animais nos quais a inibição da enzima xantina oxidase não foi efetuada, permitindo a livre formação destas espécies reativas e, por conseguinte os seus efeitos, quando comparados com os ratos nos quais efetivamente se interferiu na formação desta espécies radicais inibindo a sua principal fonte geradora, a enzima xantina oxidase.

COHEN et al., 1992, demonstrou resultados semelhantes ao do presente estudo, ou seja, a quimiluminescência (QL), medida durante o período de isquemia hepática em ratos, permaneceu inalterada. Entretanto, 20 minutos após a reperfusão os seus valores ascenderam significativamente. Naqueles animais que receberam, previamente ao procedimento, alopurinol, os valores desta medida não foram distintos daqueles encontrados no período isquêmico.

Recentemente, estudos utilizando a ressonância "spin" eletrônica como uma forma de mensuração direta das EAO formadas, no efluente venoso de diferentes órgãos de animais submetidos a isquemia e após a reperfusão arterial de órgãos, demonstrou uma redução de 85% na formação de EAO naqueles animais que receberam superóxido dismutase extra e intracelular com heparina e de 65% naqueles que receberam apenas heparina quando comparados com os animais do grupo controle que receberam apenas substâncias sem princípio ativo (NILSSON et al., 1993; FRANSSEN et al., 1995). Estudos como estes demonstram de uma maneira definitiva a formação de espécies radicais em tais situações.

Estes dados analisados isoladamente definem características fundamentais na síndrome isquemia e reperfusão de órgãos, ou seja, a geração de espécies reativas oxidantes associadas a reperfusão e que a enzima xantinaoxidase parece ser a fonte principal na geração das mesmas,

tendo em vista que a inibição de sua atividade torna a formação de malondialdeído e a emissão de energia luminosa semelhante àquela dos animais controles. Os efeitos da oxidação de membranas biológicas, estruturas essenciais para a integridade estrutural e funcional das células, certamente afetam de forma significativa as características das mesmas o que pode refletir as observações já vistas em nível de função hepática e taxa de mortalidade.

A isquemia e reperfusão hepática está, portanto, (PALLER et al.,1984; FRANSSEN et al.,1995; CONNOLLY et al.,1995; DESCOTES et al.,1995) associada a produção de EAO e o fígado apresenta no momento da reperfusão uma deficiente proteção anti-oxidante decorrente do consumo destes elementos, assim como, da maior produção de substratos geradores de radicais livres, advindo destes fenômenos um desequilíbrio entre anti-oxidantes e pró-oxidantes, resultando na indução da lipoperoxidação dos ácidos graxos presentes nas membranas celulares. Os resultados obtidos no presente trabalho utilizando o alopurinol, pela menor formação de malondialdeído no grupo de animais que recebeu esta droga, torna bastante evidente o fato do envolvimento das EAO no fenômeno de isquemia e reperfusão, tendo em vista a potencial capacidade de inibição por este fármaco de rota metabólica importante de geração desta espécies radicais.

Além disso, a menor produção de energia luminosa emitida por carbonilas excitadas, avaliado pelo método da quimiluminescência, indica uma menor geração de EAO, elementos instáveis quimicamente e, portanto, extremamente reativos, no grupo de animais que recebeu pré-tratamento com o alopurinol quando comparado com o grupo que não recebeu esta substância, é prova confirmatória indireta do envolvimento da via da xantinaoxidase na geração destas espécies radicais e, que a mesma pode, pelo menos em parte, ser controlada pela droga testada neste experimento.

Trabalhos de outros autores como COHEN ,1992, em trabalho experimental com ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, demonstrou que o pré-tratamento dos animais com alopurinol preveniu a emissão de energia luminosa, avaliada pela quimiluminescência, evidenciando potencial desta substância em modificar a formação de EAO e possivelmente reduzir o dano aos órgãos nos quais uma isquemia transitória é necessária. Estes dados sugerem, assim como os obtidos no presente estudo, no qual dados semelhantes foram obtidos, que a inibição da enzima xantinaoxidase pelo alopurinol pode exercer um papel central na prevenção da formação de EAO, induzidas pela isquemia e reperfusão.

Outros mecanismos para o efeito protetor do alopurinol tem sido arrolados, dentre os quais, destacam-se o seu potencial de ação como scavenger de radicais superóxido, estabilizador da membrana mitocondrial,

facilitando a transferência de elétrons e, finalmente, uma possível ação desta droga sobre a infiltração neutrofílica, que teriam o potencial de liberar EAO após sua mobilização para o local da injúria (COHEN, 1992). Esta última tem recebido cada vez mais atenção pelo fato de substâncias anti-inflamatórias terem demonstrado efeito benéfico na redução do dano após eventos de isquemia e reperfusão. Além disso, outros estudos demonstram o potencial envolvimento da rota do óxido nítrico como mediador. Recentemente lesão em nível do endotélio vascular sinusoidal tem recebido atenção como um potencial evento relacionado injúria observada em órgãos submetidos a isquemia transitória (MENGER, 1995; IMAMURA et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995).

A mortalidade pós-operatória, como reflexo da injúria isquêmico-reperfusional, com os intervalos de tempo adotados, no grupo de animais submetidos a isquemia sem pré-tratamento com alopurinol ascende a cifras de 46,67% dos animais, enquanto naqueles pré-tratados com alopurinol houve um importante decréscimo para 20%, o que vai ao encontro dos resultados obtidos pela maioria dos autores. Também, a maior taxa de mortalidade observada nas primeiras 24 horas após o procedimento reflete, o efeito de um fenômeno agudo, não exclusivamente relacionado a necrose hepatocitária mas, a presença de fenômenos extremamente deletérios para o animal após restabelecida a reperfusão sanguínea.

HIRASAWA et al., 1978, demonstraram em seu estudo, no qual ratos foram submetidos a clampeamento troncular durante 60 minutos, com derivação esplâcnica porto-femoral através de um cateter de polietileno, para excluir a congestão esplâcnica da interferência no parâmetro de mortalidade, que a sobrevivência dos animais foi de apenas 43,8%, enquanto isquemias de 90 minutos se associaram a uma mortalidade de 76,9% e, após 120 minutos todos os animais foram ao óbito. Embora sem uma distinção estatisticamente significativa, reflete uma tendência de um efeito protetor do alopurinol na isquemia e reperfusão hepática. Provavelmente, o uso de um maior número de animais estabeleceria uma relação significativa neste parâmetro.

MARUBAYASHI et al., 1991, demonstrou resultados semelhantes, com 60% de sobrevivência pós-operatória em animais submetidos derivação esplâcnica e isquemia hepática de 60 minutos. Entretanto, isquemia por períodos de 90 e 120 minutos estavam, invariavelmente, associados a uma mortalidade de 100%. Acreditam estes autores que o dano mitocondrial associado a estes períodos de isquemia são considerados irreversíveis.

SHITO e cols., 1997, observaram uma mortalidade de 55% nas primeiras 24 horas após isquemia seletiva de 90 minutos e, além disso, apenas 30% dos animais sobreviveram durante 7 dias após o procedimento cirúrgico, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo onde

todos os animais sobreviveram após as primeiras 48 horas, que parece ser o período crítico onde a evolução se define.

Alterações histopatológicas tem sido evidentes em animais submetidos a isquemia hepática seguida da reperfusão. O pico destas alterações tem sido referidas nos primeiros 2 dias regredindo gradativamente após 21 dias. Congestão vascular, edema, necrose multifocal com infiltração neutrofílica são os achados histopatológicos mais freqüentes 24 horas após o procedimento e corroborador no presente estudo (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

Além disso, resultados semelhantes aos de outros autores (NAUTA et al., 1990) puderam ser observados, no que se refere a necrose celular, no presente estudo, onde nas primeiras 24 horas após a isquemia normotérmica, a presença da mesma foi de intensidade mais pronunciada naqueles animais que não receberam o alopurinol em quando comparados aos animais nos quais esta substância foi administrada no pré-operatório. Entretanto, a necrose hepatocitária observada nestes últimos foi significativa, o que demonstra que a isquemia não é isenta de efeitos adversos e apresenta efeitos deletérios sobre a economia hepática, e justifica os resultados obtidos no que se refere, por exemplo, na mortalidade dos animais. Entretanto, nesta última é necessário considerar o fenômeno da congestão vascular com efeitos deletérios significativos sobre as

características hemodinâmicas dos animais. Além disso cabe ressaltar a dificuldade na avaliação quantitativamente exata dos dados assim como os limites de variabilidade da escala utilizada como referencial, de modo que, estudos mais detalhados bem como o auxílio da microscopia eletrônica possam definir com mais exatidão os aspectos relacionados a histopatologia.

As alterações morfológicas após reperfusão não podem se atribuídas diretamente ao período isquêmico propriamente dito, portanto, outras causas têm sido questionadas (HANSSON et al., 1982).

Hipoperfusão de áreas centrolobulares e sinusoidais por unidade de área em 50 e 40%, respectivamente, foi atribuída em parte ao aumento do conteúdo de cálcio e seus efeitos vasoconstritores, efeito este atribuído, mais recentemente a síndrome pós-isquêmica paradoxal ou não-reperfusional, com alterações no fluxo sanguíneo no momento da reperfusão, levando a um período de isquemia normotérmica mais prolongada e, outra possibilidade, seria a formação de agentes nocivos em conexão com a recirculação como as EAO (HANSSON et al., 1982; NAUTA et al., 1990). Evidências de tal fenômeno podem justificar a pronunciada congestão vascular observada no presente estudo nas análises feitas 24 e 48 horas após o procedimento isquêmico.

Os mecanismos envolvidos nesta síndrome tem sido atribuídos ao envolvimento da via do óxido nítrico, modulador vascular, e intimamente associado às EAO e à via do ácido araquidônico, além disso outros a serem definidos (BACH et al., 1996; SHITO et. al., 1997).

As células endoteliais apresentam um papel central no dano celular decorrente da isquemia e reperfusão. Durante a isquemia, o endotélio é submetido a alterações bioquímicas que eventualmente levam ao estímulo de suas células, induzindo a ativação de vários mecanismos pós-isquêmicos como a ativação do complemento, quimiotaxia de granulócitos, produção de edema com a conseqüente interferência na microcirculação sangüínea e perda da integridade endotelial (KOBAYASHI et al., 1995; MENDER, 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Estes eventos pós-isquêmicos são responsáveis, pelo menos em parte, pela injúria associada a reperfusão e levam a uma alteração na microcirculação sangüínea (“não reperfusão” e “reperfusão paradoxal”) que pode prolongar ou agravar os efeitos da isquemia (HERTLE & GARTHOFF, 1985; MENDER, 1994; PAPADIMITRIOU et al.,1995; KOBAYASHI et al., 1995; MENDER, 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

Estudos recentes como o de KOBAYASHI et al.,(1995), tem ressaltado a importância do óxido nítrico no fenômeno isquêmico-reperfusional como modulador da atividade leucocitária. O óxido nítrico

diminui a adesão leucocitária e migração transendotelial, reduzindo a ativação de fosfolipases e conseqüentemente a geração de reações em cascata que levariam a formação e aderência destes mediadores inflamatórios em nível celular.

O óxido nítrico provavelmente exerce uma ação crítica na proteção tecidual contra a infiltração neutrofílica, evento associado a uma resposta de natureza inflamatória associado a alterações hemodinâmicas complexas, principalmente pós-isquêmicas (KINGSLEY et al., 1996).

A lesão endotelial pode interferir na liberação do fator de relaxamento vascular derivado deste endotélio que tem sido identificado como sendo o óxido nítrico (KOBAYASHI et al., 1995). No sistema vascular o óxido nítrico age como relaxante vascular, assim como, inibidor da agregação plaquetária e neutrofílica. A interferência neste fenômeno pode resultar em um incompleto retorno do fluxo sanguíneo para a microcirculação, assim como a agregação plaquetária e migração leucocitária pronunciada após a reperfusão (KOBAYASHI et al., 1995). O óxido nítrico apresentando um elétron desemparelhado pode agir como acceptor de elétrons de EAO e, portanto, agir como detoxificador destas espécies radicais (KOBAYASHI et al., 1995). Este aspecto torna-se bastante evidente quando N-nitro-L-arginina (LNAME), inibidor da síntese de óxido nítrico, administrado à ratos submetidos a isquemia seletiva hepática de 60 minutos, causou uma

significativa redução do fluxo sanguíneo a este órgão, após ter sido liberado o pinçamento vascular, assim como uma elevação mais pronunciada das enzimas (AST, ALT, LDH) quando estes achados foram comparados aos obtidos de animais controles. Além disso, uma significativa maior lipoperoxidação é observada nos animais que receberam esta substância. Estes aspectos reforçam a hipótese do envolvimento do óxido nítrico como detoxificador de EAO e sua importância na restauração do fluxo sanguíneo em nível de sinusóides hepáticos, aspecto fundamental para restituição da função mitocondrial (KOBAYASHI et al., 1995).

Estes aspectos são reforçados por estudos como o de LOPEZ-NEBLINA et al.,(1996), no qual comprovam a participação significativa da via do óxido nítrico e do ácido araquidônico na síndrome isquêmica reperfusional. Ou seja, observaram, estes autores, que a administração de nitroprussiato de sódio, substância com ação modulatória sobre o óxido nítrico, previamente a reperfusão, conferia proteção a função renal destes animais de maneira significativa quando comparados com grupos de ratos que não receberam esta substância. Além disso, a mortalidade foi significativamente menor entre os animais que receberam nitroprussiato de sódio 75, 30 e 15 minutos antes da reperfusão quando comparados com os controles. Por outro lado, KOBAYASHI et al.,(1995), utilizando o inibidores da óxido nítrico sintase (L-NAME) e drogas precursoras do óxido nítrico (L-arginina) em ratos submetidos a isquemia hepática, concluíram que a ação

do óxido nítrico apresenta efeitos benéficos na viabilidade das células endoteliais e dos hepatócitos, assim como, uma melhor manutenção do fluxo sanguíneo após a reperfusão sangüínea. As principais ações atribuídas e mediadas pelo óxido nítrico seriam a sua ação protetora na viabilidade endotelial, bloqueio de efeitos vasoconstritivos de substâncias liberadas em situações de estresse, evitando, por conseguinte, o acúmulo e agregação leucocitária e plaquetária, efeitos todos que confluem para uma maior viabilidade celular do órgão envolvido (BROWSE et al.,1994; KOBAYASHI et al.,1995; GRUNFELD et al.,1995; ALEXANDER,1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996). Também por apresentar um elétron desemparelhado o óxido nítrico agindo como acceptor de elétrons de outras espécies radicais (superóxido) poderia agir como detoxificador desta espécie radical reduzindo a lipoperoxidação lipídica celular (KOBAYASHI et al.,1995). A interação celular endotélio leucocitária está fortemente associada com manifestações de injúria parenquimal com conseqüente perda da integridade endotelial e as manifestações decorrentes desta, ou seja, edema intersticial, dano celular parenquimal e disfunção do órgão. Estudos experimentais têm claramente demonstrado que a cascata de ativação leucocitária e interação leucocitária endotelial, assim como, a liberação de componentes citotóxicos pelos granulócitos, isto é, espécie ativas do oxigênio, mediadores lipídicos, enzimas lisossomiais promovem as manifestações da injúria reperfusional. Estes aspectos são evidenciados pelo fato de que a inibição, com anticorpos monoclonais, das interações

leucocitárias e da liberação de seus mediadores citotóxicos efetivamente atenua a injúria microvascular e disfunção orgânica (MARZI et al.,1992; MENGER,1995).

O envolvimento de mediadores inflamatórios tem sido ressaltados e demonstrados em diversos estudos como estando associado ao fenômeno isquêmico-reperfusional, associados ou não às EAO e ou dependentes da formação das mesmas. As células de K pffer, macrófagos específicos do fígado, são reconhecidamente células com potencialidade de produzir uma variedade de mediadores biologicamente ativos e tóxicos, tais como, proteases, espécies reativas do oxigênio, leucotrienos e fatores de necrose tumoral e, portanto, fortemente relacionadas na injúria hepática em vários modelos de estudo experimental com este órgão, entre os quais o da isquemia e reperfusão (CHIEN et al.,1977; IMAMURA et al., 1995; SAKR & ABDEL-AAL, 1996; KON et al.,1997).

Prostaglandinas vasodilatadoras aumentam o fluxo sanguíneo para o fígado. Assim a prostaciclina (PGI₂) aumentada em rela o aos seus cong neres vasoconstritoras (tromboxane) pode exercer efeito citoprotetor. O uso de inibidores da síntese de tromboxane no modelo de isquemia e reperfusão de KOBAYASHI et al.,1995, demonstrou ser benéfico   fun o hepática, a o principalmente atribuído aos efeitos sobre a microcircula o

hepática, interferindo no fenômeno de hipoperfusão pós-isquêmico (IMANISHI et al., 1997).

Além disso, TAKAYAMA et al., 1994 e CONNOLLY et al., 1995, utilizando substâncias antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais em distintos órgãos submetidos a estresses produtores de EAO, obtiveram resultados que demonstram a importância da via do ácido araquidônico neste processo, onde o diclofenaco de sódio mostrou capacidade de prevenir a lipoperoxidação de hepatócitos de ratos submetidos a isquemia e reperfusão deste órgão.

Estudos histopatológicos demonstram uma significativa redução da necrose centrolobular nos animais que receberam catalase, superóxido dismutase e alopurinol, isoladamente (NAUTA et al., 1990). Estudos experimentais demonstram que após isquemia e reperfusão hepática as EAO estão implicadas como causa de aumento tecidual da água e decréscimo no consumo de oxigênio, níveis de ATP e síntese protéica. A isquemia prolongada e, a subsequente reperfusão, pode produzir alterações morfológicas em órgãos que se caracterizam especificamente por: edema de células endoteliais e intersticiais e subsequente necrose tecidual (NAUTA et al., 1990)

Sessenta a 90 minutos de isquemia produz necrose de aproximadamente 50% das células avaliadas através de estudos histopatológicos e uma mortalidade de 50% (XIA et al., 1996). Há significativa recuperação energética após reperfusão em períodos de isquemia intermitente quando comparados com períodos mais prolongados desta (XIA et al., 1996). Além disso, os períodos de isquemia contínua são significativamente mais deletérios do que aquela intercalada por períodos de reperfusão. Este último aspecto é evidente no estudo em tela quando se compara os gráficos dos Experimentos 1 e 3, no qual alterações metodológicas foram utilizadas de modo que fatores outros como a congestão esplâncnica não possa ser referido como fator de confusão na análise dos resultados obtidos.

Embora deva se considerar que a isquemia por si só não é isenta de efeitos deletérios, de modo que o diferencial observado em nível de função e lipoperoxidação assim como na mortalidade entre os animais tratados e não com alopurinol previamente a isquemia pode, talvez, representar o dano adicional causado pela reperfusão e conseqüente geração de EAO. Este aspecto é reforçado, principalmente, quando se observa os resultados da lipoperoxidação, onde a isquemia sem reperfusão apresentou uma menor formação de malondialdeído e também uma menor emissão de energia luminosa, pelas carbonilas excitadas, quando comparado com o grupo de animais no qual a reperfusão se seguiu à isquemia. E, mais

especificamente, este aspecto é bastante evidente na análise de diferentes períodos de reperfusão e os níveis de lipoperoxidação. Além disso, quando a administração do alopurinol foi acrescentada, neste experimento, os valores dos parâmetros avaliados foram semelhantes aos daqueles animais nos quais não havia sido permitida a reperfusão, o que denota uma clara influência desta droga em mecanismos metabólicos em nível celular e subcelular (organelas). É, também evidente, que o uso ou associação de outras substâncias, assim como, outros métodos de avaliação podem fornecer elementos que elucidem outras rotas metabólicas além de permitir outras maneiras quantificáveis de avaliação do dano celular e por conseguinte dos órgãos estudados.

Embora alguns autores questionem a atividade da xantinaoxidase no tecido hepático, os resultados do nosso experimento, assim como, o de outros autores sugerem fortemente a existência de importante e significativa participação da atividade desta enzima e o seu envolvimento no mecanismo de injúria hepática associada a isquemia e reperfusão deste órgão. Portanto, a isquemia e reperfusão de órgãos está associado a uma série de eventos complexos que envolvem a quase totalidade dos componentes celulares, contudo, a evidência de qual(is) o(s) mecanismo(s) que finalmente tornam irreversível a morte celular não é clara e permanecem como fonte inexorável de pesquisa e estudos científicos tendo em vista a

importância que isso representa para a biologia orgânica e conseqüente aplicação clínica(KARWINSKI et al.,1991; KARWINSKI et al.,1993).

Estes aspectos são fundamentais, pois abrem um amplo campo para a pesquisa e, desta maneira, uma melhor compreensão dos fenômenos que se processam em nível celular associado a assim chamada síndrome da isquemia e reperfusão, permitindo interferir nesta, através de uma maneira racional, tendo em vista as diferentes situações clínicas associadas a mesma com que nos deparamos freqüentemente.

Além disso, como este parece ser um fenômeno universal, associado a isquemia e reperfusão de qualquer órgão, os resultados deste experimento podem pelo menos em parte ser estendidos a situações que possam estar associadas a este tipo de injúria.

Estes dados analisados no seu conjunto fornecem evidências praticamente inequívocas do envolvimento das EAO no dano funcional hepático associado a isquemia e reperfusão.

6. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo pudemos concluir que:

1) A isquemia do fígado de ratos causa dano hepático de intensidade significativa apresentando uma relação diretamente relacionada com o tempo do período isquêmico.

2) A reperfusão hepática, que se segue a um período de isquemia, está associada a lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos e, a formação de EAO ~~parecem~~ ser os elementos subjacentes causadoras de tal oxidação.

3) As técnicas de determinação da lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos, pelos métodos do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e da QL(Quimiluminescência), foram desenvolvidos e com resultados concordantes entre si caracterizando a atividade das EAO, validando os mesmos como métodos de quantificação do grau de oxidação

dos componentes lipídicos das membranas celulares, como inferência do dano celular.

4) A formação de malondialdeído, produto da lipoperoxidação dos componentes lipídicos das membranas celulares causado pela atividade das EAO, foi significativamente maior naqueles animais nos quais a reperfusão hepática foi permitida, e também naqueles animais que não receberam pré-tratamento com alopurinol, droga com potencial de interferir em uma das rotas (enzima xantinaoxidase) de geração das EAO. Aqueles animais que receberam a referida droga no pré-operatório, mostraram valores semelhantes aos dos animais nos quais não se permitiu a reperfusão. A quimiluminescência, que mede a energia luminosa emitida pelas carbonilas excitadas quando as mesmas retornam ao seu estado fundamental de repouso, demonstrou resultados semelhantes aos encontrados pelo método do TBARS, concordância fundamental para validação do método, ou seja, atividade reduzida naqueles animais nos quais a reperfusão não foi permitida e não distinta da daqueles animais que receberam pré-tratamento com alopurinol, porém significativamente menor do que a observada nos animais que não receberam esta substância. Estes dados são evidências objetivas e quantificáveis do envolvimento da reperfusão assim como da rota metabólica da xantinaoxidase na geração de EAO com significativo potencial lesivo. Além disso, reforça a teoria da presença significativa desta enzima em nível de tecido hepático.

5) A mortalidade pós-operatória de ratos submetidos a isquemia pré-tratados ou não com alopurinol não demonstraram uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto, os resultados obtidos definem uma tendência de menor mortalidade naqueles animais pré-tratados com a referida substância.

6) a avaliação histopatológica do tecido hepático, à microscopia óptica, demonstrou que o dano decorrente da isquemia-reperfusão ocorre em nível vascular e tecidual. Congestão vascular (sinusoidal, centrolobular e espaço porta) foi a característica mais evidente entre aqueles animais submetidos a isquemia, porém sem uma clara distinção entre os grupos de animais tratados e não com alopurinol. A necrose hepatocitária foi significativamente maior naqueles animais que não receberam alopurinol no pré-operatório quando comparados aos animais nos quais esta droga foi administrada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROSIO, G.; TRITTO, I.; CHIARIELLO, M. The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J. Mol. Cell. Card.*, vol. 27 p.1035-39, 1995.
- ALEXANDER, B., ASLAM, M., BENJAMIN, I.S. Hepatic function during prolonged isolated liver perfusion using a new miniaturized perfusion circuit. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, vol. 34 p. 203-10, 1995.
- ALEXANDER, B. The role of adenosine, ATP and nitric oxide in portal venous induced hepatic arterial vasodilation. *Liver Innerv.* , vol.33 p.283-8, 1996.
- BACH, F.; SINGER, D.; SCHIEDL, A.; BAUER, M.; LARSEN, R. High energy phosphates and direct calorimetry as predictive parameters for metabolic recovery of the rat liver following ischemia. *Acta Anesthesiol. Scand.*, vol. 40 p. 940-7, 1996.
- BELLO-KLEIN, A. Contratura cardíaca induzida pelo peróxido de hidrogênio . Porto Alegre:Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994. 200 p. Tese de Doutorado em Fisiologia- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.
- BENDINELLI, P.,PICCOLETTI, R., MARONI, P.,BERNELLI-ZAZZERA,A. The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion. *Fed. Eur. Biochem. Societ.*, vol.398, p.193-7, 1996.
- BOROS, M.; TAKAICHI, S.; HATANAKA, K. Ischemia tissue dependency of reperfusion injury following complete arterial occlusion of the rat small intestine. *Transplant. Proc.*, vol.27(5) p. 2789-90, 1995.
- BROWSE, D.J.; MATHIE, R.T.; BENJAMIN, I.S.; ALEXANDER, B. The transhepatic action of ATP on the hepatic arterial and portal venous vascular beds of the rabbit:The role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, vol.113 p.987-93, 1994.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, vol.52 p.302-9,1978.

- BULKEY, G.B. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, vol. 94(3) p. 407-11, 1983.
- CHAVEZ-CARTAYA, R.; DESOLA, G.P.; RAMIREZ-ROMERO, P.; CALNE, S.R.Y.; JAMIESON, N.V. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J.Surg. Res.*, vol.60 p.199-206,1996.
- CHEUNG, J.Y.; BONVENTRE, J.V.; MALIS, C.D.; LEAF, A. Calcium and ischemic injury. *The N. E. J. Med.*, vol. 314(26) p.1670-6, 1983.
- CHIEN, K.R.; ABRAMS, J.; PITT, R.G.; FARBER, J.L. Prevention by chlorpromazine of ischemia liver cell death. *Am. J. Pathol.* vol. 88(3) p. 539-55, 1977.
- CONNOLLY, J.K.; GUY, S.P.; PARROT, N.R. Cytokine gene expression and eicosanoid production in renal reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2816-18, 1995.
- COHEN, P.J. Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can. J. Anaesth.*, vol. 39 p.1090-3, 1992.
- COTRAN, RS; KUMAR, V; ROBBINS, SL. *Rim. IN: COTRAN, RS; KUMAR, V; ROBBINS, SL: Patologia Estrutural e Funcional., 4ª Ed., Guanabara-koogan,1989,W.B. Sanders Company, Rio de janeiro, Cap. 21 p. 831-91.*
- CROSS, C.E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E.T.; PRYOR, W.A.; AMES, B.; SAUL, R.L.; McCORD, J.M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Inter. Med.*, vol.107(4) p.526-45,1987.
- CUNNINGHAM, S.K.; KEAVENY, T.V.; FITZGERALD, P. Effect of allopurinol on tissue ATP, ADP and AMP concentrations in renal ischemia. *Br. J. Surg.*, vol. 61 p.562-5, 1974.
- DEFRAIGNE, J.O.; PINCEMAIL, J.; DETRY, O.; FRANSSEN, C.; MEURISSE, M.; LIMET, R. Variations of glutathione and vitamina E concentrations after hypothermic storage in Euro-collins solution and reperfusion of the rabbit kidney. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2783-5, 1995.
- DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Free Rad. Med. Biol.*, vol. 492 p. 153-68, 1980.
- DENNIS, V.W. Avaliação da função renal. IN: WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H. *Cecil: Tratado de Medicina Interna, Ed. Guanabarra, 18 Ed., 1985, Rio de Janeiro,RJ, Cap. 76 p. 460-6.*

- DESCOTES, J.L.; PAYEN, E.; CHAPELIER, E.; RAMBEAUD, J.J.; FERRARI, M.; MAZUER, J.; ODIN, J. Cold and renal warm ischemia and postoperative survival in rabbits with autotransplanted kidneys. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2874-6, 1995.
- DI LISA, F.; SILVERMAN, H.S.; HANSFORD, R.G. Mitochondrial function and cell injury in single cardiac myocytes exposed to anoxia and reoxygenation. *Tranplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2829-30, 1995.
- DREWS, G.; SPIEGEL, H.U.; HERMSDORF, T.; DETTMER, D.; RICHTER, V.; HAUSS, J. Cytoprotective effects of a stable prostacyclin analog and a calcium channel blocker: a study on isolated rat hepatocytes. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2799, 1995.
- ELION, G.B. Allopurinol and others inhibitors of urate. IN: ELION, G.B. Uric acid. *Handbruch der experimentelburn pharmakologie*. Kelley wn, Weiner IM Eds, Vol.51 Springer-Verlag, Berlim,1978, p. 485-514.
- FOSCHI, D.; CASTOLDI, L.; LESMA, A.; MUSAZZI, M.; BENEVENTO, A.; TRABUCCHI, E.. Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur. J. Surg.*, vol.159 p.393-8, 1993.
- FRANSSEN, C.; DEFRAIGNE, J.O.; DETRY, O.; PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; LAMY, M. Antioxidant defense and free radical production in a rabbit model of kidney ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2880-3, 1995.
- FREDERIKS, W.M.; KOOIJ, A.; BOSCH, K.S. Role of xanthine oxidase activity in tissue damage of rat liver after ischemia. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2855-6, 1995.
- GALAT, J.A.; ROBINSON, A.V.; RHODES, R.S. Postischemic renal dysfunction: The limited role of xantine oxidase- generated oxygen free radicals. *J. Surg. Res.*, vol. 49 p.488-492, 1990.
- GERSCHMAN, R. Historical introduction to the "free radical theory of oxigen toxicity. IN: GILBERT, D.L. Oxygen and living processes. An Interdisciplinary approach. Springer-Verlag, New York, Hidelberg, Berlin, vol.1 cap.2 p. 44-46, 1981.
- GOLDIN, J.R. Pesquisa em saúde: Leis, normas e diretrizes. 2ª. ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Grupo de pesquisa e Pós-Graduação, 1995.
- GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUI, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiate chemiluminescence: on assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Biol. Med.*, vol.10 p.93-100, 1991.

- GRANGER, D.N.; RUTILI, G.; McCORD, J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, vol. 81 p.22-6, 1981.
- GREENE, E.L.; PALLER, M.S. Xanthine oxidase produces O_2^- in porthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, vol. 263 p. 251-255, 1992.
- GRISHAM, M.B. Interaction between nitric oxide and superoxide: Role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplant. Proc.*, vol.27(5) p.2842-3, 1995.
- GRUNFELD, S.; HAMILTON, C.A.; MESAROS, S.; McCLAIN, S.W.; DOMINICZAK, A.F.; BOHR, D.F.; MALINSKI, T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*, vol. 26(6) p. 854-857, 1995.
- GÜRKE, L.; MARX, A.; SUTTER, P-M.; SEELING, J.; HARDER, J.; HEBERER, M. Allopurinol improves postischemic skeletal muscle performance and endurance but not high-energy phosphate levels. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5):2840, 1995.
- GUYTON AC- A célula e seu funcionamento. IN: GUYTON AC- Tratado de Fisiologia Médica. 8 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Kogan, 1991. p 8-20, 654-661.
- HANSSON, R.; BRATELL, S.; BURIAN, P.; BYLUND-FELLENIS, A.C.; JONSSON, O.; LUNDGREN, O.; LUNDSTAN, S.; PETTERSSON, S.; SCHERSTEN, T. Renal function during reperfusion after warm ischaemia in rabbits: an experimental study on the possible protective effects of pretreatment with oxygen radical scavengers or lidofflazine. *Acta. Physiol. Scand.*, vol. 139 p.39-46, 1990.
- HANSSON, R.; GUSTAFSSON, B.; JONSSON, O.; LUNDSTAN, S.; PETTERSON, S.; SCHERSTEN, T.; WALDENSTRÖM, J. Effect of xanthine oxidase inhibition on renal circulation after ischemia. *Transplant. proc.*, vol. 14(1) p. 51-8, 1982.
- HASSELGREN, P-O. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg. Gynecol. Obstet.*, vol. 164 p.187-96, 1987.
- HERTLE, L.; GARTHOFF, B. Calcium channel blocker nisoldipine limits ischemic damage in rat kidney. *J. Urol.*, vol.134 p.1251-1254, 1985.
- HIGGINS, G.M.; ANDERSON, R.M. Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.*, vol. 2 p. 186-202, 1931.

- HIRASAWA, H.; CHAUDRY, I.; BAUE, A.E. Improved hepatic function and survival with triphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. *Surgery*, vol. 83(6) p. 655-62, 1978.
- HUGUET, C.; NORDLINGER, B.; GALOPIN, J.J., BLOCH, P., GALLOT, D. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. *Surg. Gynecol. Obst.*, vol. 147 p.689-94, 1978.
- IMAMURA, H.; SUTTO, F.; BRAULT, A.; HUET, P-M. Role of kupffer cells in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*, vol.109 p.189-97, 1995.
- IMANISHI, H., SCALES, W.E., CAMPBELL D.A. Tumor necrosis factor alpha alters the cytotoxic effect of hydrogen peroxide in cultured hepatocytes. *Bioch. Biophys. Res. Communic.*, vol. 230, p.120-4, 1997.
- INSEL, PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, JG & LIMBIRD, LE (Eds). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* . 9 ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 617-658.
- ISOZAKI, H.; GIGOU, M.; SZEKELY, A.M.; SHEN, M.; BISMUTH, H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br. J. Surg.*, vol. 79 p.310-13, 1992.
- 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.*, vol. 193 p.275-83, 1993.
- 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*, vol. 52(2) p.231-4, 1991.
- 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.*, vol. 159:355-9, 1993.
- KOBAYASHI, H.; NONAMI, T.; KUROKAWA, T.; TAKEUCHI, Y.; HARADA, A.; NAKAO, A.; TAKAGI, H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J. Surg. Res.*, vol. 59 p.772-9, 1995.
- KOBAYASHI, T., ESATO, K., MORITA, N., NOSHIMA, N.S. Effects of thromboxane A2 Synthesis inhibitor (OKY-046) on total liver ischemia in rats. *Int. Surg.*, vol.81, p. 115-8, 1996.

- KON, S.; IMAI, M.; INABA, H. Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats. *Anesthesiology*, vol. 86(1) p. 128-36, 1997.
- LANZIOTTI, V.M.N.; BARROS, H.M.T.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, M. Padrões éticos para utilização de animais de laboratório em pesquisa médica. *Rev. Pesq. Méd.*, vol. 28(2) p. 26-30, 1994.
- LEE, S-M.; KIM, K.H. Rebamipide ameliorates hepatic dysfunction induced by ischemia/reperfusion in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 294 p.41-6, 1995.
- LEFEBVRE, V.; GOFFIN, I.; CALDERON, P.B. Fructose protects rat hepatocytes during hypoxia and improves protein synthesis recovery during reoxygenation. *Transplat. Proc.*, vol. 27(5) p.2823-4, 1995.
- LEHNINGER, A.L.(Ed). *Princípios de Bioquímica*. 2 Ed. São Paulo: Sanvier, 1995. p. 16-354.
- LINAS, S.L.; WHITTENBUR, G.D.; REPINE, J.E. Role of xanthine oxidase in ischemia/ reperfusion injury. *Am. J. Physiol.*, vol. 258 p. 711-16, 1990.
- LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOWERIS, A.; MILEI, S. Comparision of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4-epiadriamycin in mice. *Tumori*, vol. 71 p. 241-9, 1985.
- LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO-PEREIRA, L.H.; IRMIRAN, R.; PAEZ-ROLLYS, A.J. Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. *Transplantation*, vol. 61(2) p.1979-83, 1996.
- LÖWRY, O.H.; ROSEBROUGH, M.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the foline reagent. *J. Biol. Chem.*, vol. 193 p.265, 1951.
- MACKENZIE, R.J.; FURNIVAL, C.M.; O'KEANE, M.A; BLUMGART, L.H. The effect of hepatic ischaemia on liver function and the restoration of liver mass after 70 per cent partial hepatectomy in the dog. *Br. J. Surg.*, vol. 62, p.431-37, 1975.
- MACKENZIE, R.J.; FURNIVAL, C.M.; O'KEANE, M.A; BLUMGART, L.H. The effects of prolonged hepatic ischaemia before 70 per cent partial hepatectomy in the dog. *Br. J. Surg.*, vol. 64 p.66-69, 1977.
- MARUBAYASHI, S., KIYOHICO, D., KAZUE, O., KAWASAKI, T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alfa-tocoferol administration. *Surgery*, vol. 99 (2), p.184-90, 1996.

- McCORD, J.M. Superoxide dismutase. *Biochemistry*, vol. 244(22), p.6049-55, 1969.
- McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The N. E. J. Med.*, vol. 312(3) p.159-63, 1985.
- McCORD, J.M. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*, vol.94(3) p.412-4, 1983.
- MAHMOUD, F.S., ABDEL-AAL, A.N. Protective effect of cyclosporine A (CyA) against the hepatic injury associated with ischemia and reperfusion. *Int. Surg.*, vol. 81, p.180-3, 1996.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. vol. 5(78), p.57-62, 1987.
- MENGER, M.D. Microcirculatory disturbance secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol.27(5) p.2863-65, 1995.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; OCHI, K.; KAWASAKI, T. Role of free radicals in ischemia rat liver cell injury: prevention of damage by alfa-tocoferol administration. *Surgery*, vol. 99(2) p. 184-91, 1986.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; YAMADA, K.; KAWASAKI, T. Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemia rat liver cell injury. *Surgery*, vol. 110(3) p. 537-43, 1991.
- MARZI, I.; KNEE, J.; BÜHREN, V.; MENGER, M.; TRENTZ, O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endotelial adherence after liver transplantation. *Surgery*, vol.111(1) p.90-7, 1992.
- MATHEWS, W.R.; GUIDO, D.M.; FISHER, M.A.; JAESCHKE, H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 16(6) p.763-70, 1996.
- MATIELI, J.E. Radicais oxigênio livres na isquemia e reperfusão hepática- Estudo experimental com a catalase. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994. p.63. Tese de Doutorado em Cirurgia- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994.
- MAYES, P.A. Oxidación biológica. IN: HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. *Manual de química fisiológica*. 7 Ed. México :El Manual Moderno, 1980. p 124 - 317.
- NAUTA, R.J.; TSIMOYIANNIS, E.; WALSH, D.B.; MILLER, D.; BUTTERFIELD, A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg. Gynecol. Obstet.*, vol. 171 p.120-5, 1990.

- NELSON, D.L.; COX, M.M. A lógica molecular da vida. IN: LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. 2 Ed. São Paulo: Sanvier, 1995. p. 1-15.
- NICOLLI, A.; COSTANTINI, P.; BASSO, E.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Potential role of cyclosporin A-sensitive mitochondrial channels in ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2825-6, 1995.
- NILSSON, V.A.; HARALDSSON, G.; BRATELL, S.; SORENSEN, V.; AKERLUND, S.; PETTERSSON, S.; SCHERSTEN, T.; JONSSON, O. ESR-measurement of oxygen radicals "in vivo" after renal ischemia in the rabbit. Effects of pre-treatment with superoxide dismutase and heparin. *Acta Physiol. Scand.*, vol. 147 p.263-70, 1993.
- NORDSTRÖM, G.; SEEMAN, T.; HASSELGREN, P-O. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery*, vol.97(6) p.679-84, 1985.
- NUNES, F.A.; KUMAR, C.; CHANCE, B.; BRASS, C.A. Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. *Dig. Dis. Scien.*, vol. 40(5): 1045-53, 1995.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt. Biochem.*, vol. 95:351-8, 1979.
- OREDSSON, S.; PLATE, G.; QVAFORDT, P. Reperfusion injury in skeletal muscle. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2831-3, 1995.
- ORTOLANI, O.; CAGGIANO, M.; MANNELLI, R.; GOLLIETTINO, A.; TUFANO, R. Protection from ischemia-reperfusion damage in patients with stroke: the role of rutin and GSH. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2877-8, 1995.
- PALLER, M.S.; HOIDAL, J.R.; FERRIS, T. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.*, vol. 74:1156-64, 1984.
- PAPADIMITRIOU, M.; ALEXOPOULOS, E.; VARGEMEZIS, V.; SAKELLARIOU, G.; KOSMIDOU, I.; METAXAS, P. The effect of preventive administration of verapamil on acute ischemic renal failure in dogs. *Transplant. Proc.*, vol. 16 p.44-46, 1994.
- PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery*, vol. 94(3) p.415-22, 1983.
- PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery*, vol. 94(3) p.428-31, 1983.

- PEITAN, L., KINGSLEY, Y., YUE, G., WONG, P.Y-K. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion with endotoxemia. *J. Inflammation*, vol. 46, p.144-54, 1996.
- POLI, G. Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin*, vol. 49(3) p.604-20, 1993.
- PRILLAMAN, H.M.; TURNER, T.T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J. Urol.*, vol. 157:340-5, 1997.
- PUNCH, J.; REES, R.; CASHMER, B.; WILKINS, E.; SMITH, D.J.; TILL, G.O. Xanthine oxidase: Its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery*, vol. 111(2) p.169-76, 1992.
- RHODEN, E.L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; BELLÓ-KLEIN, A.; KALIL, A.; PEREIRA-LIMA, L.; RHODEN, C.R. Lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos causada pela formação de radicais livres em fígados submetidos à isquemia-reperfusão: modelo experimental em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, vol. 86(1) p.2-5, 1996.
- RHODEN, E.L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; BELLÓ-KLEIN, A.; KALIL, A.N.; PEREIRA-LIMA, L.; RHODEN, C.R. Efeito da reperfusão na lesão tecidual causada por radicais livres em ratos submetidos à isquemia hepática. *Rev. GED*, vol. 15(2) p.49-52, 1996.
- RINALDI, M.; MARTINELLI, L.; VOLPATO, G.; MINZIONI, G.; GOGGI, C.; MANTOVANI, V.; VIGANO, M. University of wisconsin solution provides better lung preservation in human lung transplantation. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2869-71, 1995.
- ROSENBLUM, E.R.; GAVALER, J.S.; VAN THIEL, D.H. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 7 p. 569-77, 1989.
- SHITO, M.; WAKABAYASHI, G.; MASAKAZU, U.; SHIMAZU, M.; SHIRASUGI, N.; ENDO, M.; MUKAI, M.; KITAJIMA, M. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation*, vol. 63(1) p.143-8, 1997.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento*. São Paulo:McGraw-Hill, 1979, p.209-18.
- SOUTHARD, J.H.; MARSH, D.C.; McANULTY, J.F.; BELZER, F.O. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery*, vol. 101(5) p.566-70, 1987.

- STEIN, H.J.; OOSTHUIZEN, M.M.J.; HINDER, R.A.; LAMPRECHTS, H. Effect of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Surg.*, vol. 165 p.96-100, 1993.
- SUC, B., PANIS, Y., BELGHITI, J., FÉKÉTÉ, F. Natural history of hepatectomy. *Br. J. Surg.*, vol.79, p.39-42, 1992.
- TAKAYAMA, F.; EGASHIRA, T.; YAMANAKA, Y. Effect of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on lipid peroxidation caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 64 p.71-8, 1994.
- TAKEMOTO, Y.; UCHIDA, M.; NAGASUE, N.; OHIWA, K.; KIMOTO, T.; DHAR, D.K.; NAKAMURA, T. Changes in calcium content of the liver during hepatic ischemia-reperfusion in dogs. *J. Hepatol.*, vol. 21 p.743-7, 1994
- WILLET, K.; VAZ DE MACEDO, D.; DETRY, O.; EVENS, A.; PEREIRA DA SILVA, L.; SLUSE, F.E. Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and "in vivo"- *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2827-8, 1995.
- YIN, M.; KURVERS, H.A.J.M.; TANGELDER, G.J.; BOOSTER, M.H.; DAEMEN, J.H.C.; KOOSTRA, G. Intravital microscope studies of the ischemically injured rat kidney during the early phase of reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2847-8, 1995.
- XIA, Z-F.; HORTON, J.W.; ZHAO, P-Y.; BABCOCK, E.E.; SHERRY, D.; MALLOY, C.R. Effects of ischemia on intracellular sodium and phosphates "in vivo" rat liver. *J. Appl. Physiol.*, vol. 81(3) p.1395-403, 1996.
- ZAGER, R.A.; GMUR, D.J. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. *Acta J. Physiol.*, vol.257 p.953-8, 1989.

NOTA: A citação das referências bibliográficas seguiu as normas preconizadas pelo Sistema Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial/ Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023, Agosto de 1989.

8. ANEXOS

Tabela 1: Resultados da concentração sérica da enzima transaminase oxalo-pirúvica (ALT,TGP) em cada período de tempo após os diferentes cirúrgicos efetuados sobre o fígado.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	120h	14d	21d	28d
Grupo I	45±5,8	46±3,5	44±7,1	46±5,1	47±4,9	44±3,6	49±8,1	45±7,9	47±9,1	44±4,5
Grupo II	45±5,8	105±15*	120±17*	45±2,9	45±3,6	47±5,3	42±3,9	45±6,8	46±6,1	45±5,7
Grupo III	45±5,8	315±24*	150±10*	50±5,6	46±7,6	45±5,9	47±9,1	41±6,3	42±5,3	43±6,9
Grupo IV	45±5,8	621±53**	290±21**	110±12**	53±6,7	49±5,4	51±3,8	49±7,5	51±8,4	50±3,9
F _(5%, 31)		596,65	384,45	152,07	2,95	1,50	2,68	1,67	2,0	2,68

* Diferença estatisticamente significativa nas medidas dos Grupos II e III em relação ao controle (Grupo I) ($p < 0.05$).

**Diferença estatisticamente significativa do Grupo IV em relação aos Grupos I, II e III ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, para um nível de significância de 95%. Grupo I: Controle, Grupo II: Isquemia, Grupo III: Hepatectomia, Grupo IV: Isquemia e Hepatectomia. Valores expressos em U/ml.

Tabela 2: Resultados da concentração sérica da enzima transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) em cada período de tempo após os diferentes procedimentos cirúrgicos efetuados.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	120h	14d	21d	28d
Grupo I	70±9	72±6	72±5	74±3,1	71±7,6	70±2,9	73±4,5	71±4,5	74±5,9	70±3,5
Grupo II	70±9	176±21*	145±36*	72±4,5	70±4,6	73±3,4	71±6,7	74±1,9	72±5,8	71±8
Grupo III	70±9	169±37*	155±24*	72±10	71±3,1	73±7,8	70±8,9	72±6,8	71±8,7	72±6,8
Grupo IV	70±9	450±82**	260±53**	130±14**	85±5,9	73±3,5	71±5,1	75±8,3	72±3,6	72±5,3
F(5%,31)		98,70	40,75	80,79	0,77	0,30	0,57	0,32	0,19	0,21

* Diferença estatisticamente significativa nas mediadas realizadas dos Grupos II e III em relação ao Grupo I ($p < 0.05$).

**Diferença estatisticamente significativa do Grupo IV em relação aos Grupos I, II e III ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I: Controle, Grupo II: Isquemia hepática, Grupo III: Hepatectomia, Grupo IV: Isquemia hepática e hepatectomia. Valores expressos em U/ ml.

Tabela 3: Resultados da concentração sérica da Fosfatase Alcalina (FA) em cada período de tempo após os diferentes procedimentos cirúrgicos efetuados sobre o fígado.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	120h	14d	21d	28d
Grupo I	40±3,5	43±5,6	42±6,2	41±2,4	38±3,5	41±7,6	40±4,8	42±3,2	40±6,8	42±4,7
Grupo II	40±3,5	50±3,5	48±6,5	45±7,1	40±2,8	42±1,9	41±2,3	42±3,5	41±4,1	42±2,4
Grupo III	40±3,5	80±4,6*	79±5,7*	75±8,4*	98±7,8*	80±4,5*	92±7,2*	130±9*	110±10*	100±11*
Grupo IV	40±3,5	98±4,5*	96±4,3*	86±4,2*	84±7,0*	78±4,3*	90±6,5*	119±8*	100±9*	98±7*
F (5%,31)		121,54	111,42	296,39	111,01	248,62	363,73	175,29	141,39	150,0

*Diferença estatisticamente significativa quando comparados os III e IV com os grupos I e II. Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I - Controle, Grupo II- Isquemia hepática, Grupo III- Hepatectomia, Grupo IV- Isquemia hepática e hepatectomia. Valores expressos em U/ ml.

Tabela 6. Concentração sérica da enzima transaminase glutâmico oxalo-pirúvica (ALT,TGP), em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol.

	0h	12h	24h	48h	72h
Grupo I	45±5,8	48,6±2,5	40,8±4,9	47±5,4	46±4
Grupo II	45±5,8	404±84*	255±74*	30,6±4,6	34,5±9,3
Grupo III	45±5,8	450±99*	271±84*	62,7±16**	35,6±8,5
$F_{(5\%,29)}$		85,85	39,47	25,23	6,91

*Diferença estatisticamente significativa quando comparados os Grupos II e III com o Grupo I ($p < 0.05$).

**Diferença estatisticamente significativa quando comparado o Grupo III com os Grupos I e II ($p < 0.05$).

Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%.

Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II- Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol, Grupo III- Isquemia hepática de 45 minutos.

Tabela 7. Concentração sérica da enzima transaminase glutâmico oxalo-acética (AST, TGO) em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática tratados e não com alopurinol.

	0h	12h	24h	48h	72h
Grupo I	70±8,9	76,6±14,3	67,8±14,5	70,8±12,38	70,8±11,56
Grupo II	70±8,9	471±194*	160±19*	82±13,98	82,38±17,7
Grupo III	70±8,9	446±111*	209±64*	120±41,9**	59,88±16
F _(5%, 29)		29,17	33,04	9,48	5,40

*Diferença estatisticamente significativa quando comparados os Grupos II e III com o Grupo I ($p < 0.05$).

**Diferença estatisticamente significativa quando comparado o Grupo III com os Grupos I e II ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I- Controle e alopurinol, Grupo II-Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol, Grupo II- Isquemia hepática de 45 minutos.

Tabela 8. Concentração sérica da fosfatase alcalina (FA) em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática tratados e não com alopurinol.

	0h	12h	24h	48h	72h
Grupo I	40±3,5	48,9±7,5	49±6,7	42,4±12	45,4±6,4
Grupo II	40±3,5	72,3±13	69,2±21	53,8±9	53,5±14
Grupo III	40±3,5	73,5±8,5	71,3±12	63±16	53,5±21
F _(5%,29)		19,4	7,22	6,64	0,97

*Diferença estatisticamente significativa do Grupo I em relação aos Grupos II e III ($p < 0.05$). Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para um nível de significância de 95%. Grupo I - Controle e alopurinol, Grupo II - Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol., Grupo III - Isquemia hepática de 45 minutos.