

ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS
POR ISQUEMIA HEPÁTICA NORMOTÉRMICA
EXPERIMENTAL

JOSÉ HUYGENS PARENTE GARCIA

FORTALEZA, 1994.

FC-00002613-7

ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR ISQUEMIA HEPÁTICA NORMOTÉRMICA EXPERIMENTAL

JOSÉ HUYGENS PARENTE GARCIA

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

FORTALEZA, 1994.

TESE
615
6216a
1994

C	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	488003
	11 1 06 1 96

021087
0488003

C	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	114
	30 1 09 1 94

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

△
José Huygens Parente Garcia

Dissertação aprovada em: 07/01/94

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
Orientador da Dissertação

Prof. Dr. Manassés Cláudio Fonteles
Dept^o de Fisiologia e Farmacologia - UFC

Prof. Dr. Luis Augusto Carneiro D'Albuquerque
USP - SP

A minha amada esposa Regina, pelo estímulo constante ao conhecimento técnico científico e participação ativa neste trabalho

Aos meus pais,
exemplo de vida dedicada
à família

As minhas filhas Denissa, Ticiania,
Clarissa e Marília, fontes perenes de
inspiração e vida

AGRADECIMENTOS

Ao orientador deste trabalho, prof. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, pelos ensinamentos e disponibilidade para as discussões, mesmo em horários noturnos, que certamente marcaram a nossa formação científica.

Ao Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, pelo valoroso auxílio na impressão desta tese e sobretudo pela boa vontade de resolver os problemas da pós-graduação.

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao, pelo incentivo e sugestões valiosas, que culminaram com o emprego da Ternatina neste estudo.

Ao Prof. Luis Augusto Carneiro D'Albuquerque, do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, que gentilmente aceitou o convite para participar da banca examinadora e sobretudo pelas sugestões na elaboração final desta tese.

Ao Prof. Manassés Claudino Fonteles, por ter aceito participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Prof. E. R. Silveira, do departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pelo fornecimento da droga Ternatina, utilizada neste trabalho.

A Dra Régia Evangelista, pela análise histopatológica das amostras de fígado.

A Profa. Glauce Socorro de Barros Viana, que gentilmente cedeu o espectrofotômetro para leitura de nossas amostras.

A todos os professores deste departamento que através dos cursos ministrados durante a pós graduação, possibilitaram um rico aprendizado

As bibliotecárias Mônica Correia Aquino e Norma Linhares, pelo apoio técnico na pesquisa bibliográfica e na normatização desta tese.

Aos colegas de mestrado, principalmente Jeane Matos e Paulo

Lavor, pela ajuda nos ensaios bioquímicos.

Ao bolsista Ivian Teixeira de Souza, que com dedicação foi indispensável na execução dos experimentos.

Aos secretários da pós-graduação Vasco Diógenes Bastos e Fabiana Maria da Silva Nascimento, sempre disponíveis para atender as nossas solicitações.

As técnicas de laboratório Erivanda, Vilani e Vanda, que com boa vontade prestaram grande ajuda na realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
Generalidades	1
Anatomia do fígado humano	2
Isquemia hepática em cães	4
Isquemia hepática em coelhos	6
Isquemia hepática em porcos	6
Isquemia hepática em macacos Rhesus	6
Isquemia hepática em ratos	7
Isquemia hepática no homem	8
Isquemia e preservação de órgãos para transplante	9
A natureza da lesão isquêmica	10
Isquemia hepática e radicais livres de oxigênio	12

Drogas com possível efeito protetor na injúria isquêmica	14
Objetivos	16
2. MATERIAIS	18
2.1. Animais experimentais	18
2.2. Soluções reagentes	18
2.3. Bioquímicos e enzimas	19
2.4. Aparelhagem	20
2.5. Diversos	20
3. MÉTODOS	22
3.1. Indução de isquemia hepática experimental	22
3.2. Animais do grupo controle	27
3.3. Delineamento do estudo	27
3.4. Preparação de sangue e tecido hepático	28
3.5. Determinação dos metabólitos	29
3.5.1. Determinação de piruvato e acetoacetato	31
3.5.2. Determinação de lactato	32
3.5.3. Determinação de 3-hidroxiacetato	34
3.5.4. Determinação de glicose	35
3.6. Cálculos dos metabólitos no sangue e fígado	36
3.7. Determinação do estado redox	37
3.7.1. Determinação do estado redox citoplasmático	38

3.7.2. Determinação do estado redox mitocondrial	38
3.8. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	
4.1. Efeitos da isquemia hepática na sobrevivência dos ratos	40
4.2. Alterações com o tempo na concentração sanguínea de lactato, piruvato e glicose	40
4.3. Alterações com o tempo na concentração sanguínea de acetoacetato, 3-hidroxiacetato, corpos cetônicos e na razão acetoacetato/3-hidroxiacetato	44
4.4. Alterações com o tempo na concentração hepática de lactato, piruvato e glicose	49
4.5. Alterações com o tempo na concentração hepática de acetoacetato, 3-hidroxiacetato, corpos cetônicos e na razão acetoacetato/3-hidroxiacetato	53
4.6. Alterações no estado redox citoplasmático e mitocondrial do fígado em resposta a isquemia hepática	58
4.7. Alterações metabólicas no sangue induzidas por tratamento dos animais com ciclosporina e tetraciclina	61
4.7.1. Lactato	61
4.7.2. Piruvato	62

4.7.3. Glicose	63
4.7.4. Acetoacetato	64
4.7.5. 3-Hidroxibutirato	65
4.7.6. Corpos cetônicos	66
4.7.7. Razão acetoacetato/3-hidroxibutirato	68
4.8. Alterações metabólicas no fígado induzidas por tratamento com ciclosporina e ternatina	70
4.8.1. Lactato	70
4.8.2. Piruvato	71
4.8.3. Glicose	72
4.8.4. Acetoacetato	74
4.8.5. 3-Hidroxibutirato	75
4.8.6. Corpos cetônicos	76
4.8.7. Razão acetoacetato/3-hidroxibutirato	77
4.8.8. Estado redox citoplasmático	78
4.8.9. Estado redox mitocondrial	80
5. DISCUSSÃO	82
5.1. Concentrações de lactato no sangue e fígado	83
5.2. Concentrações de piruvato no sangue e fígado	88
5.3. Concentrações de glicose no sangue e fígado	89
5.4. Concentrações dos corpos cetônicos no sangue e fígado	92

5.5. Razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue e fígado	94
5.6. Estado redox citoplasmático e mitocondrial	97
5.7. Ações da ciclosporina na injúria pós-isquêmica do fígado	99
5.8. Ações da ternatina na injúria pós-isquêmica do fígado	104
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 - Alterações com o tempo nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no sangue	44
TABELA 02 - Alterações com o tempo nas concentrações dos corpos cetônicos e razão acetoacetato / hidroxibutirato no sangue.	49
TABELA 03 - Alterações com o tempo nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no fígado.	53
TABELA 04 - Alterações com o tempo nas concentrações dos corpos cetônicos e razão acetoacetato / 3-hidroxibutirato no fígado.	57
TABELA 05 - Alterações com o tempo no estado redox citoplasmático do fígado.	59
TABELA 06 - Alterações com o tempo no estado redox mitocondrial do fígado.	60
TABELA 07 - Alterações nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	64
TABELA 08 - Alterações nas concentrações dos corpos cetônicos e razão acetoacetato/3-hidroxibutirato no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	69
TABELA 09 - Alterações nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	73
TABELA 10 - Alterações nas concentrações dos corpos cetônicos e razão acetoacetato / 3-hidroxibutirato no fígado em resposta ao	

tratamento com ciclosporina e ternatina.	78
TABELA 11 - Alterações no estado redox citoplasmático do fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	79
TABELA 12 - Alterações no estado redox mitocondrial do fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Diagrama da anatomia do fígado do rato com clampeamento seletivo do pedículo vascular	22
FIGURA 02 - Foto do clampeamento seletivo do pedículo vascular hepático	23
FIGURA 03 - Foto mostrando lobos hepáticos isquemiados (mediano e lateral esquerdo) e não isquemiados (caudado e lateral direito).	24
FIGURA 04 - Diagrama da hepatectomia dos lobos não isquemiados	25
FIGURA 05 - Foto da hepatectomia dos lobos não isquemiados	26
FIGURA 06 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de lactato no sangue	41
FIGURA 07 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de piruvato no sangue	42
FIGURA 08 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de glicose no sangue	43
FIGURA 09 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de acetoacetato no sangue	45
FIGURA 10 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de 3-hidroxiacetato no sangue	46
FIGURA 11 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações dos corpos cetônicos no sangue	47

FIGURA 12 - Representação gráfica das alterações com o tempo na razão acetoacetato / 3-hidroxiacetato no sangue	48
FIGURA 13 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de lactato no fígado	50
FIGURA 14 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de piruvato no fígado	51
FIGURA 15 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de glicose no fígado	52
FIGURA 16 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de acetoacetato no fígado	54
FIGURA 17 - Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações de 3-hidroxiacetato no fígado	55
FIGURA 18- Representação gráfica das alterações com o tempo nas concentrações dos corpos cetônicos no fígado	56
FIGURA 19 - Representação gráfica das alterações com o tempo na razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no fígado	57
FIGURA 20- Representação gráfica das alterações com o tempo no estado redox citoplasmático do fígado	58
FIGURA 21 - Representação gráfica das alterações com o tempo no estado redox mitocondrial do fígado	60

FIGURA 22 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de lactato no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	61.
FIGURA 23 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de piruvato no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	62
FIGURA 24 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de glicose no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	63
FIGURA 25 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de acetoacetato no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	65
FIGURA 26 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de 3-hidroxiacetato no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	66
FIGURA 27 - Representação gráfica das alterações nas concentrações dos corpos cetônicos no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	67
FIGURA 28 - Representação gráfica das alterações na razão acetato/3-hidroxiacetato no sangue em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	69.
FIGURA 29 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de lactato no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	71

FIGURA 30 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de piruvato no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	72
FIGURA 31 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de glicose no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	73.
FIGURA 32- Representação gráfica das alterações nas concentrações de acetoacetato no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina.	74
FIGURA 33 - Representação gráfica das alterações nas concentrações de 3-hidroxiacetato no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	75.
FIGURA 34 - Representação gráfica das alterações nas concentrações dos corpos cetônicos no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	76.
FIGURA 35 - Representação gráfica das alterações na razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	77
FIGURA 36 - Representação gráfica das alterações do estado redox citoplasmático do fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	79
FIGURA 37 - Representação gráfica das alterações do estado redox mitocondrial do fígado em resposta ao tratamento com ciclosporina e ternatina	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	- Trifosfato de adenosina
C	- Controle
Cya	- Ciclosporina
DDO	-Diferença de Densidade Óptica
EDTA	- Acido etilenodiaminotetraacético
EPM	- Erro Padrão da Média
E. V	- Endovenoso
G ₆ PD	- Glicose-6-fosfato desidrogenase
g	-Grama
h	- Hora
H ⁺	- Ion Hidrogênio
HBD	- 3-hidroxi-butirato desidrogenase
K	- Constante de equilíbrio
Kg	- Quilograma
LDH	- Lactato desidrogenase
ml	- Mililitro
mg	- Miligrama
M	- Molar
mM	- Milimolar
NAD ⁺	-Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	-Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	-Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP ⁺	-Forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nm	- Nanômetro
μmol	- Micromol

RESUMO

ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR ISQUEMIA HEPÁTICA NORMOTÉRMICA EXPERIMENTAL

A interrupção completa do fluxo sanguíneo para o fígado é frequentemente necessária durante operações para trauma hepático ou quando a ressecção extensa de um tumor é efetuada. Transplante de fígado é inevitavelmente associado com períodos de isquemia completa. No entanto, o pinçamento do pedículo hepático é limitado pelas consequências da injúria pós-isquêmica do fígado.

Isquemia hepática normotérmica por 60 minutos foi induzida no rato. Em seguida, as alterações com o tempo (0, 1, 6 e 24h) nas concentrações sanguínea e hepática de lactato, piruvato, glicose, corpos cetônicos e razão acetoacetato/3-hidroxiacetato, bem como o estado redox citoplasmático e mitocondrial das células hepáticas foram determinados.

Um grupo de animais foi pré-tratado com ciclosporina (10 mg/Kg) e outro grupo com ternatina (25 mg/Kg) e estudados no tempo 1h após revascularização hepática.

A isquemia hepática causou elevação da concentração hepática de lactato no fígado, sugerindo que pronunciado grau de metabolismo anaeróbico ocorreu durante o período de isquemia. Isquemia hepática acarretou ainda queda da concentração e da razão dos corpos cetônicos (acetoacetato/3-hidroxiacetato) no sangue arterial no tempo 1 h após revascularização, refletindo que a injúria isquêmica do fígado interfere com a cetogênese.

O tratamento com ciclosporina e ternatina causou elevação da concentração dos corpos cetônicos e da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial após 1h de reperfusão hepática, sugerindo que estas drogas aceleram a cetogênese e conseqüentemente a recuperação da lesão isquêmica do fígado. É possível que a utilização de ciclosporina ou ternatina em receptores antes do transplante ou o uso em soluções de preservação, possa melhorar os resultados de transplante de fígado.

ABSTRACT

Metabolic alterations induced by experimental normothermic hepatic ischaemia

The complete interruption of the blood flow to the liver is often necessary during operations for hepatic trauma or when extensive resection to remove a tumor is mandatory. Hepatic transplantation is inevitably associated with periods of complete ischaemia. However, the clamping of the hepatic vascular pedicle is limited by the consequences of the post-ischaemic injury to the liver.

Normothermic hepatic ischaemia during sixty minutes was induced in the rat. The time-course (0, 1, 6, 24h) of changes in the blood and the hepatic concentrations of lactate, pyruvate, glucose, ketone bodies and in the ratio of acetoacetate/3-hydroxybutyrate, as well as the cytoplasmic and mitochondrial redox state of the liver cells were determined.

A group of animals was pre-treated with cyclosporine (10 mg/Kg i. p.) and another group with ternatin (25 mg/Kg i. p.) and then they were studied 1h after hepatic revascularization.

Hepatic ischaemia caused elevation in the concentration of lactate in the liver, suggesting that a pronounced level of anaerobic metabolism occurred during the ischaemia period.

Liver ischaemia promoted yet a fall in the concentration and in the ratio of ketone bodies(acetoacetate/3-hydroxybutyrate) in the arterial blood in the studied period of one hour post-revascularization, perhaps reflecting impairment of ketogenesis as a result of the ischaemia injury.

The treatment with cyclosporine and ternatin caused elevation in the concentration of ketone bodies and in the ratio acetoacetate/3-hydroxybutyrate in the arterial blood one hour after reperfusion of the liver, suggesting that these drugs may accelerate the recovery of the ischaemic hepatic lesion. It is possible that the utilization of cyclosporine or ternatin in transplant recipients or their use in transplant preserving solutions, may help to improve the results of liver transplantation.

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo considerou-se que o fígado humano só suportaria isquemia normotérmica por 15 minutos, baseado principalmente em trabalhos experimentais em cães (RAFFUCI et al., 1953, DRAPANAS et al., 1955), onde observou-se que acima de 30 minutos acarretaria lesão hepática grave. No entanto, pacientes têm sobrevivido a períodos mais prolongados de isquemia, e há muitos casos descritos na literatura em que a veia porta e a artéria hepática foram pinçadas por tempo superior a 60 minutos, sem complicações significativas (WALTUK et al., 1970, HUGUET et al., 1978, BISMUTH et al., 1982, PATCHTER et al., 1983, DELVA et al., 1989, TERBLANCHE et al., 1991).

Estudos experimentais têm demonstrado que a oclusão total do suprimento sanguíneo aferente para o fígado em animais é mal tolerada como consequência da aparente susceptibilidade do fígado à lesão anóxica (JOLLY e FOSTER, 1963, BACKLUND et al., 1965). Esta susceptibilidade do fígado à isquemia normotérmica foi posteriormente questionada, e em alguns trabalhos o tempo de isquemia foi progressivamente aumentado em cães com descompressão esplâncnica através de uma anastomose porto sistêmica (JOLLY e FOSTER, 1963, MACKENZIE et al., 1977).

Fatores diferentes de necrose hepática têm sido considerados como responsáveis pela alta mortalidade após isquemia hepática completa. Estes fatores incluem choque endotóxico (BATTERSBY et al., 1974), hipovolemia (BRUNSCHWIG, 1955) e liberação de substâncias vasoativas (JOSEPH et al., 1968). Durante a isquemia aguda, o potássio é liberado pelas células hipóxicas e altos níveis séricos deste íon têm sido descritos (BACKLUND et al., 1965), podendo acarretar arritmias cardíacas severas em cães (HALL,

1972).

Como o cão apresenta sérias desvantagens como modelo para isquemia hepática devido as dificuldades de interpretação dos resultados, outros modelos experimentais foram introduzidos incluindo modelos com macaco Rhesus (McMASTER e MEDD, 1977), porco (NORDLINGER, et al., 1980), coelho (DELPIN et al., 1975) e, ultimamente, o rato (KAWANO et al., 1989).

A interrupção completa do fluxo sanguíneo para o fígado é frequentemente necessária durante operações devido trauma hepático grave ou quando a ressecção extensa de um tumor é efetuada (PACHTER et al., 1983, DELVA et al, 1984). Transplante de fígado é inevitavelmente associado a períodos de isquemia completa. A circulação hepática é também reduzida durante o choque hemorrágico (LINDBERG, 1977), após trauma severo (NUNES et al., 1970) e em sepse prolongada (CHAUDRY et al., 1979, TOWNSEND et al, 1986). Ligadura da artéria hepática, advogada no tratamento de certos tumores do fígado e em lesões traumáticas, reduz o fluxo sanguíneo total do fígado (MAYS, 1977).

Os níveis de energia celular caem rapidamente quando o fígado é privado de fluxo sanguíneo (MARUBAYASHY, 1980) e vários graus de degeneração estrutural e metabólica têm sido descritos durante e após isquemia hepática (CHAUDRY et al., 1981; PARKS et al., 1988). Nos últimos anos, atenção tem sido dirigida para prevenir ou reduzir as consequências da diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo para o fígado.

ANATOMIA DO FÍGADO HUMANO

O fígado é a maior glândula do corpo humano, pesando de 1.000 a 3.000 gramas no adulto. Pode ser dividido em lobos direito e

esquerdo, com o plano de divisão anterior se estendendo sobre a vesícula biliar e veia cava inferior. Todavia, o fígado é, de fato, um órgão bilateral, consistindo das metades direita e esquerda, que estão claramente divididas.

A irrigação do fígado é dupla a partir da artéria hepática comum e veia porta. A veia porta transporta principalmente o sangue venoso proveniente do trato gastro-intestinal para os sinusóides hepáticos. A veia porta ascende atrás do ducto biliar e da artéria hepática comum, e no hilo hepático, ela se divide em ramos direito e esquerdo.

A artéria hepática origina-se na aorta conjuntamente com a gástrica esquerda e a esplênica, formando o tronco celíaco. Classicamente ela ascende à esquerda do ducto biliar principal e anteriormente à veia porta, onde se divide em ramos direito e esquerdo.

A drenagem do fígado ocorre geralmente através de três veias chamadas hepáticas ou suprahepáticas (esquerda, média e direita), que se esvaziam na veia cava inferior retrohepática.

Portanto, a circulação aferente do fígado é composta pela veia porta e artéria hepática que juntas com a via biliar ascendem ao hilo hepático, permitindo o pinçamento em bloco destas estruturas e, conseqüentemente, a parada total do aporte de sangue a este órgão. Desta forma, diversos procedimentos cirúrgicos incluindo transplante, hemostasia no trauma, ressecção de tumores primários e secundários podem ser facilitados por reduzir drasticamente o

sangramento hepático trans-operatório. A idéia de interromper temporariamente a vascularização aferente do fígado, com o objetivo de diminuir a hemorragia parenquimatosa durante a ressecção hepática é antiga, tendo sido descrita por PRINGLE em 1908.

ISQUEMIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL EM CÃES

DUCHINOVA (1925) descreveu isquemia hepática em 42 cães e notou que o método produzia perda menor de sangue no campo operatório. No entanto, observou que mortes ocorreram quando o período de oclusão excedeu 35 minutos e que nenhum dos cães sobreviveu a uma hora de isquemia.

DEWEESE e LEWIS (1951) pinçaram a circulação aferente para um segmento do fígado por ligadura permanente de um dos ramos principais da veia porta e, simultaneamente, oclusão temporária da artéria hepática. Este procedimento foi aparentemente bem tolerado pelos cães, e os autores concluíram que a manutenção do fluxo portal mesmo em um pequeno segmento do fígado, reduzia a mortalidade quando comparado com a oclusão total dos vasos hepáticos.

A ligadura definitiva da artéria hepática é sabidamente fatal em cães (BEHREND et al., 1922, HUGGINS et al., 1937). No entanto, a administração prévia de antibióticos reduziu significativamente a mortalidade induzida pela ligadura da artéria hepática (FITTS et al., 1950, FRASER et al., 1951). Duas peculiaridades do fígado canino,

principalmente colonização endógena por clostrídios produzindo necrose hepática infectada, e os esfíncteres das veias hepáticas, causando auto-bloqueio do fluxo venoso, são responsáveis pela susceptibilidade do fígado do cão à injúria isquêmica (CHAU et al., 1951, MORENO et al., 1962, BACKLUND et al., 1965). Outros autores observaram também que a eficácia de antibióticos como a penicilina na diminuição da mortalidade, pode estar relacionada com a redução no número de bactérias anaeróbicas normalmente presentes no fígado canino (RAFFUCI et al., 1953).

Estudos posteriores mostraram que um período de pinçamento do pedículo hepático mais prolongado poderia ser tolerado por cães, desde que se realizasse a descompressão do sistema venoso portal através de anastomose mesentérico-cava, sugerindo que a estagnação de sangue no trato gastro-intestinal contribuía para a mortalidade (JOLLY e FOSTER, 1963; BACKLUND et al., 1965).

Outro estudo realizado com o objetivo de avaliar as alterações bioquímicas da isquemia hepática em cães, concluiu que mesmo com uma anastomose descompressiva do sistema portal, o tempo seguro de sobrevivência foi de 40 minutos. Após 80 minutos de isquemia, a mortalidade foi de 100%. Estes autores notaram ainda alterações metabólicas marcantes no fígado, como elevação do lactato e fosfato inorgânico, além do aumento acentuado de transaminases e fosfatase alcalina (FARKOUH et al., 1971)..

ISQUEMIA HEPÁTICA EM COELHOS

O coelho é um animal que suporta bem o pinçamento do pedículo hepático sem necessidade de anastomose descompressiva do sistema venoso portal. Estudos utilizando este animal evidenciaram que a administração de metilprednisolona protege o fígado contra a isquemia normotérmica, especialmente quando empregado antes da oclusão, e reduz dramaticamente a mortalidade (FIGUEROA et al., 1975, DELPIN et al., 1975).

ISQUEMIA HEPÁTICA EM PORCOS

Outro animal utilizado como modelo experimental é o porco e o período máximo de segurança para o pinçamento do pedículo hepático é cerca de 35 minutos (BATTERSBY et al., 1974). Empregando descompressão portal através de desvio externo espleno-jugular, foi possível, mesmo em condições normotérmicas, prolongar por 2 horas a isquemia hepática em porcos, causando apenas alterações microscópicas moderadas nos hepatócitos (NORDLINGER et al., 1980).

ISQUEMIA HEPÁTICA EM MACACOS RHESUS

Com o objetivo de conhecer a tolerância do fígado do macaco rhesus a isquemia total, sem a realização de descompressão do

sistema portal, e ao mesmo tempo visando avaliar as alterações do íon potássio, McMASTER e MEDD (1977) estudaram seis macacos após oclusão do pedículo hepático. Os três animais expostos a 20 minutos de isquemia completa não apresentaram complicações e sobreviveram. Os três animais restantes expostos a 25, 35 e 45 minutos de isquemia, acordaram da anestesia, mas as condições clínicas foram se deteriorando, resultando em óbito com 8, 9 e 12 horas de pós-operatório, respectivamente. Hipercalemia não foi observada neste grupo. Os autores concluíram que isquemia hepática total, sem descompressão do sistema venoso portal em macacos, produz alterações hepáticas severas somente após 25 minutos de isquemia em condições normais de temperatura.

ISQUEMIA HEPÁTICA EM RATOS

O modelo experimental com o rato tem muitas vantagens, pois se trata de animal de pequeno porte, resistente, abundante nos biotérios e de baixo custo. Porém, este animal não suporta o pinçamento do pedículo hepático, provavelmente devido a estase de sangue no trato gastro-intestinal, necessitando de complexo desvio entre o sistema portal e a circulação sistêmica. Com a descompressão portal, evita-se a congestão visceral, a instabilidade hemodinâmica e o óbito (FIGUEROA et al., 1975, HIRASAWA et al., 1978).

Entretanto, baseando-se nas características anatômicas do

fígado do rato, composto por quatro lobos bem delimitados e com pedículos vasculares próprios, um grupo japonês realizou, com sucesso, isquemia seletiva do fígado ocluindo a vascularização para os lobos principais (mediano e lateral esquerdo), mas mantendo o fluxo portal através dos lobos caudado e lateral direito. Desta forma, é possível avaliar com uma técnica relativamente simples, as alterações decorrentes da isquemia hepática (KAWANO et al., 1989).

ISQUEMIA HEPÁTICA NO HOMEM

Estudos clínicos em humanos utilizando o pinçamento do pedículo hepático para ressecções hepáticas, estenderam o período de isquemia para 60 minutos, não ocorrendo aumento de complicações pós-operatórias, falência hepática ou mortalidade. Estes estudos concluíram que o objetivo principal, durante a ressecção hepática, é reduzir o sangramento operatório, e que o pinçamento portal atinge esse alvo, podendo prolongar-se seguramente por até 60 minutos (HUGUET, 1978, DELVA et al., 1989) . Apesar destes aspectos, o período máximo de segurança em que o suprimento sanguíneo para o fígado no homem pode ser interrompido em condições normais de temperatura, permanece desconhecido. As controvérsias giram em torno das consequências hemodinâmicas do pinçamento do pedículo hepático e do risco de lesão isquêmica do fígado.

No homem, o pinçamento do pedículo hepático aumenta constantemente a pressão arterial tanto sistólica quanto diastólica, apesar de baixa moderada do débito cardíaco. A resistência vascular periférica aumenta em 50%. A pressão arterial pulmonar permanece estável. Após revascularização, os parâmetros hemodinâmicos voltam aos valores normais em alguns minutos (TERBLANCHE et al., 1991).

A importância clínica do pinçamento do pedículo hepático é inquestionável. A consideração da tolerância do fígado à isquemia é de grande interesse na cirurgia do trauma, na ressecção de tumores primários e secundários, e é vital em transplante quando um órgão viável deve ser usado.

ISQUEMIA E PRESERVAÇÃO DE ÓRGÃOS PARA TRANSPLANTE

Os transplantes de órgãos como rim, coração, fígado e pâncreas são atualmente uma realidade, possibilitando a recuperação de milhares de pacientes com doenças terminais. O aumento do uso de órgãos de doadores com morte encefálica em muitos países, incluindo o Brasil, junto com a necessidade de remoção de múltiplos órgãos de cada doador, tem contribuído para melhor conhecimento clínico e metabólico dos doadores em potencial e chamado a atenção para as condições ideais de preservação. Diversos centros de transplantes foram criados no mundo inteiro, e

através de saudável intercâmbio entre estes centros, órgãos são retirados em um Estado e enviados para outro a centenas de quilômetros de distância, onde exista um receptor compatível. O problema limitante é a lesão isquêmica, que poderá acarretar danos irreversíveis ao órgão.

A NATUREZA DA LESÃO ISQUÊMICA

As alterações estruturais celulares, que acompanham a isquemia, afetam as mitocôndrias, os núcleos, os retículos endoplasmáticos, os lisossomas e, finalmente, as membranas celulares. A distinção precisa entre lesão reversível e irreversível é de difícil determinação, porém certamente as alterações microscópicas nas mitocôndrias constituem característica proeminente do dano irreversível inicial, e a ruptura das membranas celulares é definitiva (PEGG, 1986).

Outro aspecto é que células diferentes possuem susceptibilidade diferentes à lesão isquêmica. No rim, as alterações ocorrem primeiro e se tornam mais intensas no túbulo contornado proximal. Após 30 minutos existem alterações macroscópicas em alguns túbulos; aos 60 minutos, existe necrose total de todos os segmentos na maioria dos túbulos. No entanto, 90% dos animais sobreviverão a 30 minutos de isquemia quente enquanto 75% sobreviverão a 60 minutos; tal fato sugere que grande parte da lesão parece ser recuperável. Porém, após 60

minutos de isquemia quente, existe evidência de lesão histológica permanente no rim (JABLONSKI et al., 1983).

Uma característica proeminente de lesão isquêmica é a tumefação das células. A bomba de sódio é responsável tanto pela manutenção do equilíbrio iônico peculiar das células quanto por seu volume celular normal; isso porque o transporte dos íons e de água encontram-se osmoticamente acoplados. Quando a bomba de sódio é bloqueada, provavelmente pela falta de ATP na isquemia como também pela redução de temperatura na preservação hipotérmica, ocorre entrada global de soluto e água dentro da célula. O papel preciso da tumefação celular na lesão isquêmica ainda é controverso, porém alguns autores compararam o efeito de um tratamento anóxico padronizado com o efeito de perfusão com uma solução hipotônica que produz um grau semelhante de tumefação celular (JAMART e LAMBOTTE, 1982). Eles demonstraram claramente que a tumefação celular hipotônica é menos lesiva do que um grau comparável de tumefação celular anóxica, confirmando que a anóxia produz danos por outros mecanismos além de tumefação celular.

Uma outra característica impressionante de um órgão que sofreu um período de isquemia quente é a incapacidade de retorno do fluxo sanguíneo quando a circulação é restaurada. Este fenômeno é de grande importância no sentido de determinar o destino de um órgão transplantado, pois as células parenquimais intactas poderão deixar de ter qualquer valor na ausência de circulação. Entretanto, o acréscimo de "Dextran 40", que inibe a agregação hemática,

melhora consideravelmente o fluxo sanguíneo. Outras evidências indicam que este fenômeno é muito pior quando existem hemácias no órgão durante o período isquêmico do que quando estas hemácias não existem. Assim sendo, parece improvável que o aumento na resistência vascular seja devido à tumefação das células endoteliais, e sim pela agregação hemática (WUSTERMAN, 1977). Esta agregação pode ser causada, parcialmente, pelo aumento de rigidez hemática que ocorre quando as células são depletadas de ATP durante a isquemia (WEED et al., 1969).

ISQUEMIA HEPÁTICA E RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

Durante a última década, considerável atenção tem sido dada ao papel potencial dos radicais de oxigênio como mediadores da microcirculação e na injúria celular associada à reperfusão de tecidos isquêmicos (PARKS e GRANGER, 1988). Em 1981, GRANGER et al. propuseram que a enzima xantina oxidase era a principal fonte de produção de oxidantes seguindo reperfusão de intestino delgado isquêmico. A hipótese era de que a isquemia acelerava a conversão de xantina desidrogenase para o radical oxigênio, produzindo xantina oxidase. Concomitantemente, ATP celular é catabolizado, durante o período de hipóxia, para hipoxantina. Com a reperfusão e conseqüente reoxigenação, o oxigênio molecular reage com hipoxantina e xantina oxidase, produzindo metabólitos de oxigênio altamente citotóxicos: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical

hidroxil.

Existem fortes evidências que radicais de oxigênio são responsáveis por parte das alterações estruturais e funcionais associadas com a reperfusão do fígado isquêmico. Administração de inibidores de radicais livres como superóxido dismutase e catalase, diminuíram a liberação de indicadores enzimáticos de injúria hepatocelular e melhoraram a função de enxertos hepáticos expostos à isquemia (ATALLA et al., 1985).

O pré-tratamento de ratos submetidos a isquemia hepática com alfa-tocoferol aumentou a sobrevivência dos animais, acelerou a resíntese de ATP e suprimiu a elevação de peróxido de lipídio. Este estudo concluiu que o dano celular causado por isquemia hepática pode ser explicado pela formação de radicais livres de oxigênio durante a isquemia, e especialmente após reperfusão, sugerindo que a administração de um removedor de radical livre e anti-oxidante como o alfa-tocoferol, é efetiva na lesão celular isquêmica (MARUBAYASHI et al, 1986). Portanto, parece provável que a preservação de órgãos para transplante pode ser facilitada pela modificação do metabolismo dos radicais livres de oxigênio (PARKS et al., 1983).

Atualmente, todos os métodos eficazes para preservação de órgãos para transplante baseiam-se na redução da temperatura como principal elemento protetor. Logo que o órgão fica isquêmico, seu suprimento de metabólitos cessa, os produtos do metabolismo são acumulados e ocorre algum dano, reversível no início, mas que

acaba se tornando irreversível. Os processos de deterioração, que acompanham a isquemia, são mediados por reações químicas, cujo ritmo depende da temperatura. O simples esfriamento tem sido bem sucedido no sentido de reduzir este dano, porém comporta muitas limitações. Alterações estruturais, biofísicas, bioquímicas e vasculares que ocorrem mesmo durante o resfriamento necessitam ainda de maiores investigações. Portanto, caso as alterações metabólicas induzidas pela isquemia fossem mais detalhadamente conhecidas, provavelmente seria possível intervir ativamente e de forma conveniente nestes processos, prolongando a viabilidade dos órgãos e, conseqüentemente, melhorando os resultados dos transplantes de órgãos de doador cadáver.

DUAS DROGAS COM POSSÍVEL EFEITO PROTETOR NA INJÚRIA PÓS-ISQUÊMICA DO FIGADO

CICLOSPORINA

Em 1976, um poderoso agente imunossupressor foi desenvolvido por BOREL e introduzido na prática de transplante renal por CALNE et al. (1978).

O número e o sucesso do transplante hepático tem aumentado a cada ano, e tal fato pode ser atribuído a melhor técnica cirúrgica, a seleção mais criteriosa dos receptores e também ao uso deste poderoso imunossupressor, a ciclosporina (STARZL et al., 1985).

A ciclosporina tem ações diferentes de outros imunossuppressores como esteróides e azatriopina; ela age preferencialmente sobre linfócitos T com influência mínima sobre a função dos linfócitos B e tem menos efeitos colaterais sobre o sistema hematopoiético e a cicatrização das feridas (BOREL et al., 1976, NEMLANDER et al., 1983).

Administração de ciclosporina (10 mg/Kg) por 3 dias, antes e depois de ressecção de 2/3 do fígado, induziu aumento significativo da proliferação de células hepáticas (KIM¹ et al., 1988). Estes autores consideram duas possibilidades para explicar este efeito: a primeira é um efeito trófico direto da ciclosporina sobre os hepatócitos; a segunda é que a ação seletiva da ciclosporina sobre as células T possa ter alguma conexão com os achados descritos.

Os efeitos da ciclosporina na regeneração hepática foram estudados em ratos após hepatectomia parcial e comparados com agentes imunossuppressores convencionais como metilprednisolona e azatioprina. Azatioprina e metilprednisolona substancialmente suprimiram mitoses dos hepatócitos; no entanto, tratamento com ciclosporina não inibiu, mas de fato estimulou a proliferação de hepatócitos (KIM² et al., 1988).

KAWANO et al., (1989), descreveram que a ciclosporina diminuía a percentagem de necrose hepática induzida por isquemia e sugeriram que o seu efeito benéfico é atribuível à inibição funcional das células T.

TERNATINA

Os flavonóides são compostos químicos naturais, derivados de 2-fenilcromona, abundantemente encontrados no reino vegetal. A ternatina, um flavonóide, é o princípio ativo extraído da “Macela da Terra” (Egletes viscosa, Less).

Os flavonóides promovem a inibição de diversas enzimas, tais como hialuronidase, xantina oxidase, Na^+K^+ ATPase, AMPc-fosfodiesterase, lipase, H^+ ATPase lisossomal, hexoquinase, lipoxigenase e cicloxigenase (HAVSTEEN, 1983). Recentemente, estudos experimentais tem mostrado que a ternatina possui propriedades anti-inflamatórias e antipiréticas (MELO et al., 1991; SOUZA e RAO, 1992). Dados do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Uiversidade Federal do Ceará, revelaram que o tratamento com ternatina foi eficaz em reduzir a disfunção hepática causada por tetracloreto de carbono em ratos (RAO, 1993).

OBJETIVOS

Utilizando-se um modelo experimental com o rato, foram estudadas as alterações metabólicas induzidas por 60 minutos de isquemia hepática normotérmica, através da determinação no sangue arterial e no fígado, de lactato, piruvato, glicose, corpos

cetônicos e razão acetoacetato/3-hidroxi-butirato. Foi também calculado o estado redox citoplasmático e mitocondrial do fígado. Estas medidas foram realizadas no final do período isquêmico e em tempos diferentes pós-isquemia com a finalidade de detectar as alterações com o decorrer do tempo nestes elementos a fim de estudar o período de recuperação do fígado.

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos protetores contra a injúria isquêmica do fígado, um grupo de animais foi pré-tratado com um flavonóide (ternatina) e outro grupo com uma droga imunossupressora (ciclosporina).

As alterações metabólicas induzidas por isquemia hepática prolongada necessitam ainda de ampla investigação, visto que os artigos publicados até o presente momento não esclarecem muitos aspectos deste evento. Portanto, o objetivo deste trabalho é definir a nível hepático e sanguíneo, algumas das alterações metabólicas causadas por isquemia hepática normotérmica em ratos, como também avaliar o possível papel hepatoprotetor da ternatina e da ciclosporina.

2. MATERIAIS

2.1. Animais experimentais

Foram utilizados 60 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, com peso médio de 300 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de aço, recebendo água e ração balanceada tipo purina "ad libitum" até o momento da cirurgia. Após a cirurgia, os animais foram mantidos isoladamente em gaiolas com oferta livre de água, mas privados de qualquer tipo de alimentação até por ocasião do estudo.

2.2. Soluções reagentes

*Acido clorídrico (HCl)

(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)

*Acido perclórico 20% (HClO₄)

(Haloquímica Ind. e Com. Ltda, São Paulo - SP, Brasil)

*Cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O)

(Grupo Química Industrial Ltda, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)

*EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético)

(C₁₀ H₁₄ N₂ O₈ Na₂.2H₂O)

*Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄)

- (Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- *Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)
(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- *Hidróxido de potássio (KOH)
(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- *Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)
(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- *Hidrato de hidrazina 80% (NH₂NH₂.H₂O)
(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- *TRIS (Hidroximetil) Aminometano (C₄H₁₁NO₃)
(Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)

2.3. Bioquímicos e enzimas

- *Adenosina -5-triphosphato
(Boehringer Mannheim - Germany)
- *Ciclosporina (Sandimmun - Sandoz)
- *Glucose-6-phosphat-deydrogenase
de *Leuconostoc mesenteroides*
(Boehringer Mannheim - Germany)
- *Hexoquinase
(Boehringer Mannheim GmbH-Germany)
- *Hydroxybutyrat-dehydrogenase
de *Rhodopseudomonas spheroides*
(Boehringer Mannheim - Germany)

*L - Alanin-deydrogenase

de *Bacillus subtilis*

*Lactat- dehydrogenase

(Boehringer Mannheim-Germany)

*NAD ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2 \cdot 3H_2O$)

(Boehringer Mannheim - Germany)

*NADH ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$)

(Boehringer Mannheim - Germany)

*Ternatina (5, 4'-dihidroxi-3, 7, 8, 3'-tetrametoxi-flavona)

(Bioflavonóide extraído e isolado de *Egletes viscosa* Less)

2.4. Aparelhagem

*Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça).

*Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (Fanem, São Paulo - Brasil).

* Espectrofotômetro (modelo DU, Beckman, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (Modernization system, Gilford, Oberlin, Ohio, USA).

* Medidor de pH micronal (pH - metro B374)

2.5. Diversos

*Cubetas para leitura ultravioleta (American Hospital Supply Corporation - USA).

- *Tubos de ensaio de vidro de 10 ml
- * Nitrogênio líquido (White Martins, São Paulo - SP, Brasil)
- *Indicador de pH universal (Reagen, Rio de Janeiro - RJ, Brasil)
- *Seringas de 3 ml e agulhas 25/7
- *Material cirúrgico: pinças, bisturi, tesoura, fios de suturas e clamps vasculares.
- *Pipetas e provetas
- *Becher de 10, 50 e 100 ml (Pyrex)
- *Grau e pistilo de porcelana
- *Garrafa térmica de 3 litros para acondicionar nitrogênio líquido durante o experimento.

3. MÉTODOS

3.1. Indução de isquemia hepática experimental

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter sulfúrico. Em seguida, uma laparotomia mediana foi realizada. As alças intestinais foram afastadas e os lobos do fígado identificados. O pedículo hepático composto pela veia porta, artéria hepática e via biliar foi isolado acima dos lobos caudado e lateral direito e posteriormente ocluído com pinça vascular (Figuras 1 e 2).

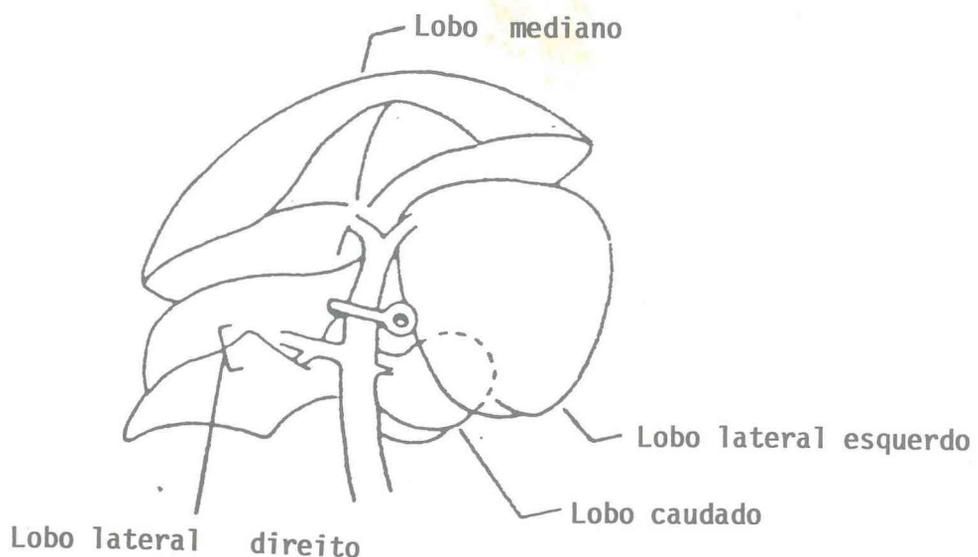


Figura 1 - Diagrama da anatomia do fígado do rato com pinçamento seletivo do pedículo vascular.

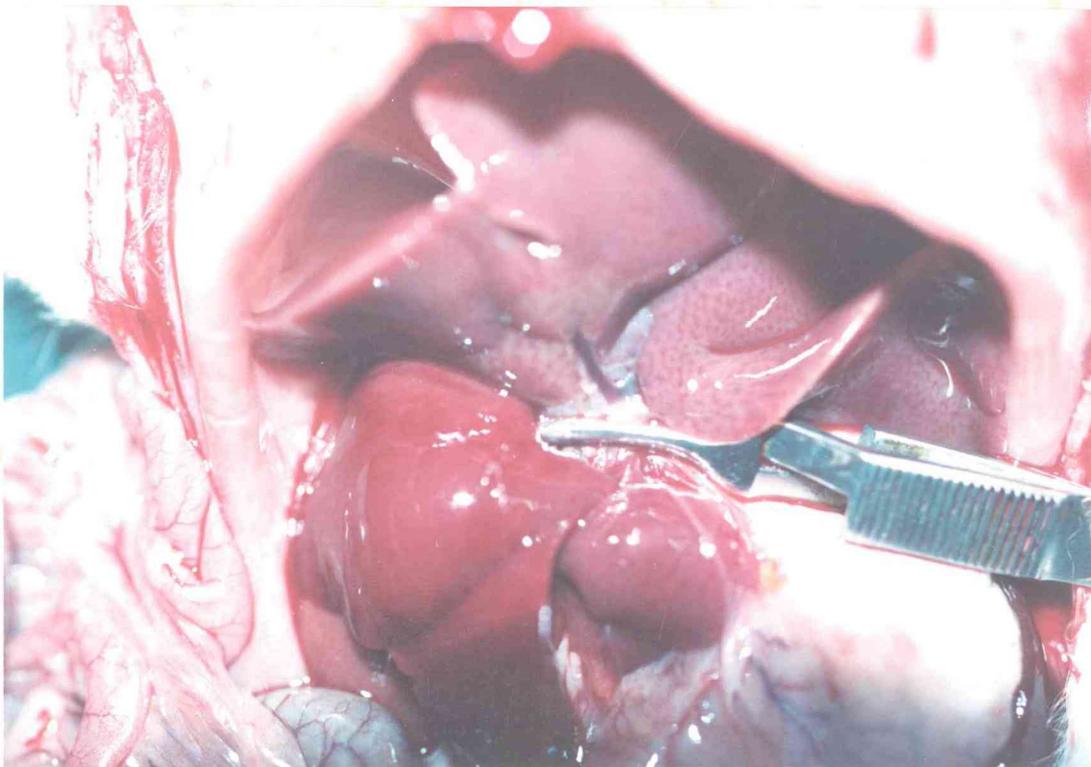


Figura 2 - Foto do pinçamento seletivo do pedículo hepático, evidenciando os vasos portais.

A oclusão completa da tríade portal no local proposto é confirmada no trans-operatório pela presença de palidez importante nos lobos mediano e lateral esquerdo, ao mesmo tempo em que os lobos inferiores não isquemiados (caudado e lateral direito) preservam a coloração habitual (Figura 3) .

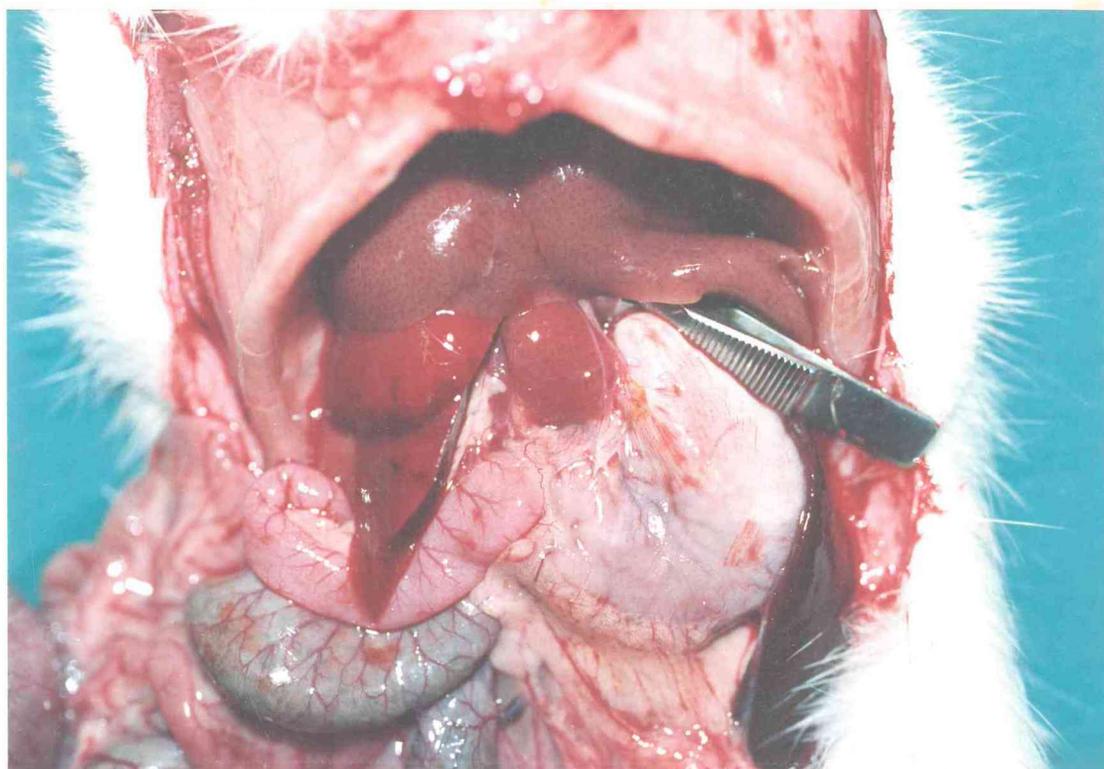


Figura 3 - Foto do pinçamento seletivo do pedículo hepático, evidenciando lobos superiores (mediano e lateral esquerdo) isquemiados e lobos inferiores (caudado e lateral direito) com boa perfusão.

A parede abdominal foi fechada em dois planos com fio de algodão e em seguida o animal foi acordado com a suspensão da inalação do anestésico, permanecendo isolado em gaiola com oferta de água.

Após 60 minutos de pinçamento da tríade portal que corresponde ao mesmo tempo de isquemia hepática, os ratos foram novamente anestesiados com éter e a ferida abdominal reaberta. Mais uma vez se confirmava a eficácia da oclusão vascular pela

isquemia dos lobos superiores (lobos mediano e lateral esquerdo). A pinça vascular foi então retirada, ao mesmo tempo em que se observava nitidamente a reperfusão dos lobos isquemiados. Os lobos hepáticos não isquemiados (caudado e lateral direito) foram então submetidos a ligadura de seus pedículos vasculares e ressecados (Figuras 4 e 5).

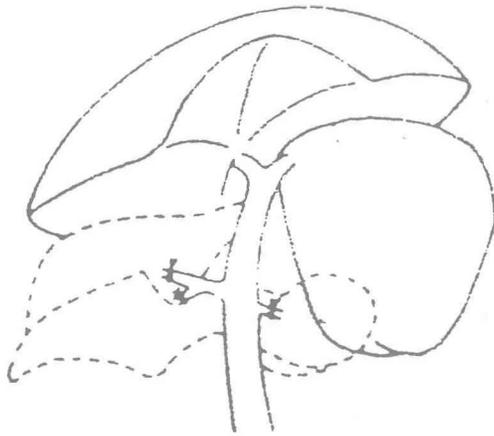


Figura 4 - Diagrama da hepatectomia dos lobos não isquemiados (caudado e lateral direito)

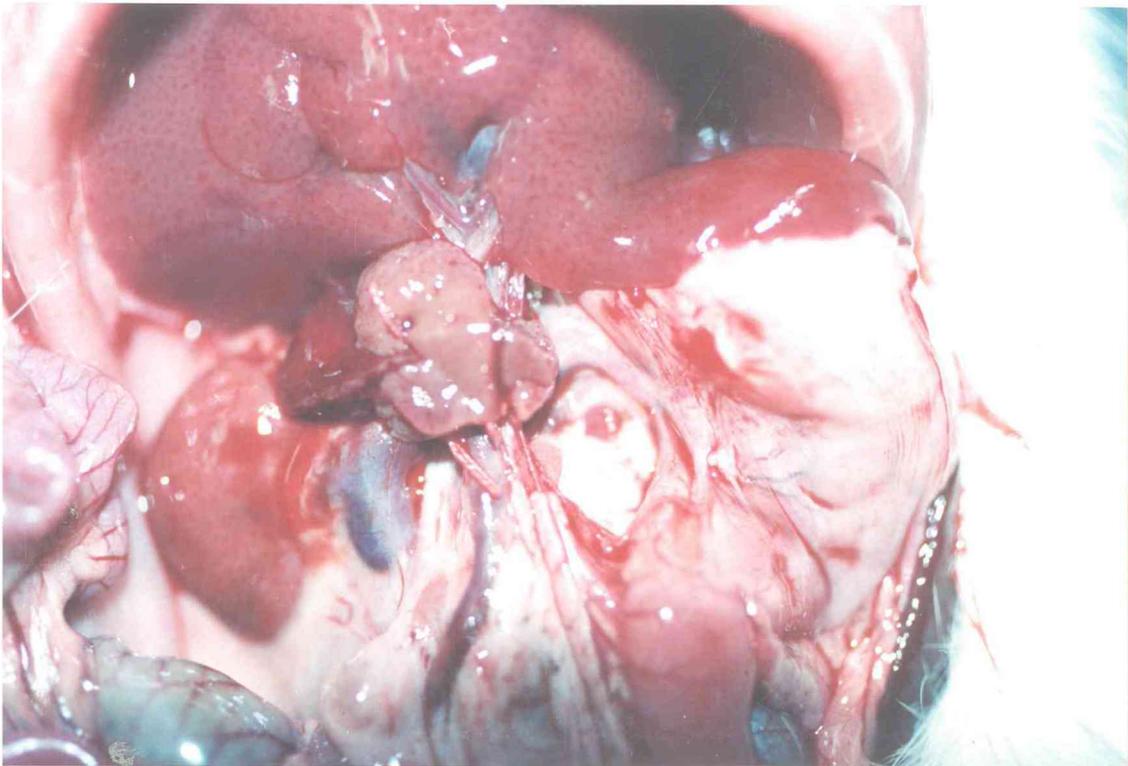


Figura 5 - Foto da hepatectomia dos lobos não isquemiados (caudado e lateral direito), mostrando os cotos de tecido hepático ressecados.

Desta forma, os animais permaneceram vivos somente com os lobos hepáticos isquemiados, permitindo estudar as alterações metabólicas induzidas pela isquemia. Caso ocorresse qualquer tipo de hemorragia trans ou pós-operatória ou se a oclusão vascular fosse incompleta, os animais eram excluídos do estudo. A ferida abdominal foi fechada por planos e em seguida os ratos foram acordados e mantidos em gaiolas com oferta de água.

3.2. Animais do grupo controle

Os animais do grupo controle foram submetidos a ressecção dos lobos hepáticos inferiores (caudado e lateral direito) sem oclusão vascular, de tal forma que permaneceram com a mesma quantidade de tecido hepático do grupo isquemiado. Todos os outros passos da anestesia e operação, além dos cuidados pós-operatórios, foram similares aos descritos para os animais com o fígado isquemiado.

3.3. Delineamento do estudo

Os animais foram inicialmente divididos em quatro grupos de 12 unidades (seis controles e seis isquemiados). Os animais submetidos a isquemia hepática foram estudados nos tempos 0, 1, 6 e 24 horas após período isquêmico. Os animais do grupo controle foram estudados também com 0, 1, 6 e 24 h de pós-operatório.

Após a análise dos resultados, foi selecionado o tempo de uma hora pós-revascularização hepática por apresentar alterações metabólicas mais marcantes. Dois grupos de animais foram tratados com ciclosporina e ternatina.

O primeiro grupo de 12 animais foi pré-tratado por quatro dias através de administração intraperitoneal de ciclosporina (10 mg/kg diluída em óleo de oliva), sendo que a metade foi submetida a uma hora de isquemia hepática normotérmica (grupo experimental) e o

restante (seis animais) foi operado sem isquemia hepática (grupo controle).

O segundo grupo de 12 animais foi pré-tratado por quatro dias através da administração intraperitoneal de ternatina (25 mg/Kg diluída em DMSO) , sendo que seis deles foram submetidos a uma hora de isquemia hepática normotérmica (grupo experimental) e os outros seis animais foram operados sem isquemia hepática (grupo controle) . Todos os animais dos dois grupos foram estudados no tempo de uma hora pós-revascularização hepática (grupo experimental) e uma hora de pós-operatório (grupo controle).

3.4. Preparação de sangue e tecido hepático

Os ratos após serem anestesiados com éter e laparotomizados, tiveram o sangue arterial colhido da aorta abdominal (1 ml) através de uma seringa de 2 ml heparinizada. Em seguida, o fígado foi removido, imediatamente prensado e mergulhado em nitrogênio líquido a cerca de 190 graus centígrados negativos (WOLLENBERGER et al., 1960). Esta técnica baixa a temperatura do tecido hepático para cerca de 80 graus centígrados negativos em um período menor que 0,1 segundo. O tecido hepático foi então transformado em uma fina camada de pó com o auxílio de um conjunto de recipientes de porcelana (grau e pistilo), sempre acrescentando-se nitrogênio líquido para manter o tecido congelado (WILLIAMSON et al., 1967). Tanto o tecido hepático em pó como o sangue arterial foram

colocados em tubos de ensaio diferentes contendo ácido perclórico 0,75 M imersos em gelo no interior de um isopor. A imersão neste ácido inativa e precipita rapidamente as proteínas, que foram removidas por centrifugação a 2.000 rotações por minuto durante 10 minutos. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante com ácido perclórico (extrato ácido) foi colocado em tubos de ensaio de vidro de 10 ml previamente pesados. Os tubos foram novamente pesados, obtendo-se desta forma o volume ácido. Um indicador universal de pH foi adicionado ao volume ácido juntamente com uma solução de Hidróxido de Potássio 20%, até que o pH permanecesse entre 7 e 8. Os tubos foram então repesados e centrifugados a 2.000 rotações por minuto durante 10 minutos, e o sobrenadante, agora um extrato neutro, foi usado para análise dos metabólitos por método espectrofométrico. Piruvato e acetoacetato têm de ser medidos logo após a neutralização, enquanto os outros metabólitos devem ser determinados dentro de no máximo duas semanas, desde que as amostras sejam congeladas e mantidas a 20 graus centígrados negativos.

3.5. Determinação dos metabólitos

Os metabólitos foram determinados tanto no fígado como no sangue da aorta, por métodos enzimáticos. Estes incluem os precursores da gliconeogênese piruvato e lactato; os corpos cetônicos acetoacetato e 3-hidroxiacetato; e a D-glicose. Antes de

apresentar detalhes técnicos sobre os vários métodos empregados na determinação desses metabólitos, serão introduzidos os princípios básicos de análise enzimática.

Um ensaio enzimático é baseado no princípio de que uma reação enzimática específica em que há participação do substrato é completada com a redução de NAD^+/NADP ou oxidação de NADH/NADPH . Os nucleotídeos piridina (NAD^+ , NADP) absorvem luz a 260 nm, e no estado reduzido (NADH , NADPH) têm uma absorção adicional com o máximo de 340 nm. Portanto, através de medida de densidade óptica à 340 nm, a conversão enzimática do substrato pode ser acompanhada diretamente em uma cubeta no espectrofotômetro. Independentemente se NAD^+ aceita H^+ ou se NADH doa H^+ , a densidade óptica aumenta ou diminui em 6,22 unidades com a produção ou consumo de um micromol de NADH/NADPH .

Sabendo-se que em uma reação enzimática específica, um micromol de substrato usualmente reage com um micromol de NAD^+/NADP (ou NADH/NADPH), a mudança na densidade óptica refletirá rigorosamente a quantidade de substrato consumida pela reação. Sendo as condições do ensaio ótimas, a conversão do substrato é praticamente completa e a diferença da densidade óptica pode ser usada para calcular a concentração do substrato no fígado ou no sangue, multiplicando-se por um fator de diluição apropriado.

A especificidade de um ensaio enzimático depende da pureza da

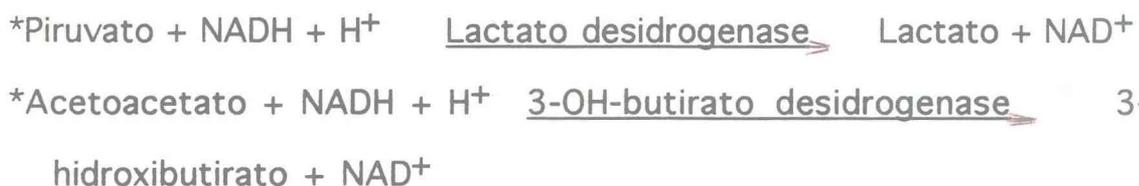
enzima, enquanto a precisão depende da realização do ensaio em condições ideais. A sensibilidade do ensaio enzimático é limitada pelo fato de que a conversão suficiente de NAD^+/NADP em NADH/NADPH ou vice-versa deve ocorrer para produzir uma mudança mensurável na densidade óptica.

Os seguintes metabólitos foram medidos por métodos enzimáticos padrão como descritos a seguir:

3.5.1. Determinação do piruvato e acetoacetato

Piruvato e acetoacetato têm condições de ensaio similares e podem ser medidos sequencialmente na mesma amostra e na mesma cubeta, de acordo com a combinação de métodos respectivamente descritos por HOHORST et al. (1959) e WILLIANSOON et al. (1962).

Sequência da reação:



O equilíbrio da primeira reação em pH 7 é suficientemente desviado para a direita, garantindo uma medida quantitativa dos níveis de piruvato desde que a concentração de NADH não seja menor que 0,01 mM. Com o mesmo pH e com um excesso de NADH compatível, pelo menos 98% do acetoacetato é reduzido para 3-

hidroxibutirato. No entanto, devido a baixa atividade da preparação de 3-hidroxibutirato desidrogenase, a segunda reação ocorre com uma velocidade menor que a primeira.

Solução tampão para o ensaio

10 ml de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,9

01 ml de NAD⁺ 0,5%

Uma solução fresca foi preparada para cada ensaio. O volume total em cada cubeta foi de 2 ml, consistindo de 1 ml da amostra contendo ácido perclórico neutralizado e 1 ml de solução tampão. A cubeta para controle continha 1 ml de água destilada e 1 ml da solução tampão do ensaio. As cubetas foram então lidas antes e 10 minutos após a adição de 0,01 ml de lactato desidrogenase à 340 nm. Em seguida, adicionou-se 0,01 ml de 3-hidroxibutirato desidrogenase em cada cubeta, que foram lidas novamente após 35 e 45 minutos.

3.5.2. Determinação do L-(+)-Lactato

As concentrações de lactato foram determinadas no fígado e sangue de acordo com o método descrito por HOHORST (1963).

Sequência da reação:



O equilíbrio desta reação ocorre no lado do lactato e NAD^+ . No entanto, para garantir a completa conversão do lactato, os produtos da reação devem ser removidos. Prótons são aprisionados por uma reação alcalina; o piruvato reage com hidrato de hidrazina na solução tampão para formar piruvato hidrazona e, em adição, um grande excesso de NAD^+ e enzima é usado para se obter rapidamente um ponto final da reação. A lactato desidrogenase reage somente com L-(+)-lactato e isto oferece especificidade para o ensaio.

Solução tampão para o ensaio:

40 ml de Tris 0,2 M

05 ml de Hidrato de hidrazina 100%

25 mg de EDTA

Completa-se para 100 ml com água destilada.

O pH da solução tampão foi ajustado para 9,5 com ácido hidrocloreto 5 M, e a solução pode ser estocada por até duas semanas a 4 graus centígrados. No início do ensaio, 1 ml de NAD^+ 1% foi adicionado a cada 10 ml de solução tampão. O volume total em cada cubeta foi de 2 ml, consistindo de 0,2 ml da amostra

neutralizada, 0,8 ml de água e 1 ml de solução tampão contendo NAD^+ 1%. Todas as cubetas foram lidas a 340 nm antes e 35 e 45 minutos após a adição de 0,02 ml da enzima lactato desidrogenase.

3.5.3. Determinação de D-(-)-Hidroxiacetato

As concentrações sanguíneas e hepáticas de 3-hidroxiacetato foram determinadas de acordo com o método descrito por WILLIAMSON et al., (1962).

Sequência da reação:



O equilíbrio da reação com pH 8 é alcançado quando aproximadamente 40% do 3-hidroxiacetato é oxidado para acetoacetato. No entanto, a presença da hidrazina na solução tampão aprisiona o acetoacetato formado como uma hidrazona e a reação segue quantitativamente da esquerda para a direita.

Solução tampão para o ensaio:

70 ml de solução tampão Tris 0,1 M, pH 8,5

0,25 ml de Hidrato de hidrazina 100%

25 mg de EDTA

Completa-se para 100 ml com água destilada

O pH da solução tampão do ensaio foi ajustado para 8,5 com ácido hidrolórico 5 M e a solução pode ser armazenada até por duas semanas a 4 graus centígrados. Antes de iniciar o ensaio, 1 ml de NAD 1% foi adicionado a 10 ml de solução tampão. O volume total em cada cubeta foi de 2 ml, consistindo de 0,5 ml da amostra neutralizada, 0,5 ml de água destilada e 1 ml de solução tampão com NAD⁺. As cubetas foram lidas a 340 nm e 50 e 60 minutos após adição de 0,01 ml da enzima 3-hidroxi butirato desidrogenase.

3.5.4. DETERMINAÇÃO DE D-GLICOSE

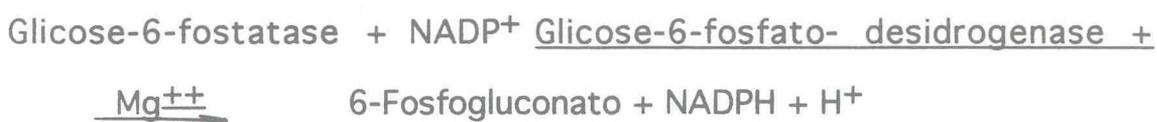
A glicose no sangue e fígado foi determinada de acordo com o método descrito por SLEIN (1963).

Sequência da reação:

a) Reação auxiliar



b) Reação indicadora



Com o pH 7,5, o equilíbrio para a reação indicadora é desviada para a direita, o que garante o término completo de ambas as reações, desde que a glicose-6-fosfatase formada na reação anterior é rapidamente usada na reação seguinte. Ainda que a hexoquinase catalisa a fosforilação de vários outros monossacarídios, a

especificidade do ensaio provém da glicose-6-fosfato desidrogenase (G₆PD) que não reage com outras hexoses ou pentoses que não seja a glicose-6-fosfato.

Solução tampão para o ensaio:

20 ml de tampão Tris 0,1 M, pH 8,0

02 ml de Cloreto de magnésio 0,1 M

02 ml de ATP 0,01 M

02 ml de NAD 1%

0,13 ml de G₆PD (1 mg/ml)

Esta solução foi renovada para cada ensaio. O volume total em cada cubeta foi de 2 ml, consistindo de 0,1 ml da amostra neutralizada, 0,9 ml de água destilada e 1 ml da solução tampão do ensaio. A cubeta controle continha 1 ml de água destilada e 1 ml da solução tampão. Todas as cubetas foram lidas a 340 nm antes e 10 e 15 minutos após adição de 0,01 ml de Hexoquinase.

3.6. CÁLCULOS DOS METABÓLITOS NO SANGUE E FÍGADO

Todos os cálculos dos metabólitos são baseados nas alterações de densidade óptica medidas à 340 nm nas amostras das cubetas, seguidas após adição da enzima e subtraídas das mudanças inespecíficas que podem ocorrer nas cubetas de controle.

Portanto:

* Diferença de densidade óptica (DDO) = (Alteração da absorbância da amostra na cubeta) - (Alteração na absorbância na cubeta controle).

Desde que o coeficiente molar de extinção de NADH é 6,22 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$, a quantidade de substrato na cubeta é igual a $(\text{DDO}/6,22) \times \text{volume total na cubeta}$. Este resultado é então multiplicado por um fator de diluição para cada amostra, resultando na concentração do substrato.

No sangue:

$(\text{Peso sangue} + \text{HClO}_4/\text{peso sangue}) \times (\text{peso extrato neutro}/\text{peso extrato ácido}) \times (\text{volume total na cubeta}/\text{volume extrato neutro na cubeta}) \times (\text{DDO}/6,22) = \mu\text{mol do metabólito/ml de sangue}$.

No fígado:

$(\text{Peso do fígado} + \text{HClO}_4/\text{peso do fígado}) \times (\text{peso extrato neutro}/\text{peso extrato ácido}) \times (\text{volume total na cubeta}/\text{volume extrato neutro na cubeta}) \times (\text{DDO}/6,22) = \mu\text{mol do metabólito/g de tecido hepático}$.

3.7. DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX

As concentrações dos substratos oxidados e reduzidos dos Sistemas Lactato e 3-Hidroxi-butirato desidrogenases foram medidas no fígado do rato. Os substratos destas desidrogenases

estão provavelmente em equilíbrio com NAD^+ e NADH , e a razão dos dinucleotídios livres pode ser calculada pela medida das concentrações dos substratos e a constante de equilíbrio (HOLZE et al, 1956).

3.7.1. DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX CITOPLASMÁTICO

Lactato desidrogenase (LDH), que está localizada somente no citoplasma da célula hepática, catalisa a seguinte reação:



Desde que esta enzima é altamente ativa no fígado, aceita-se que esta reação tende para o equilíbrio. Portanto, a seguinte equação deve ser correta: $K_{\text{LDH}} = [\text{Piruvato}] \times [\text{NADH}] / [\text{Lactato} \times \text{NAD}^+]$

onde K_{LDH} é a constante de equilíbrio. Portanto:

$$[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}] = [\text{Piruvato}] / [\text{Lactato}] + 1/K$$

Desde que as concentrações de piruvato e lactato foram medidas no fígado e o valor de K_{LDH} foi medido in vitro ($1,11 \times 10^{-4}$) (WILLIAMSON et al, 1967), a razão $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$ no compartimento citoplasmático pode ser calculada.

3.7.2. DETERMINAÇÃO DO ESTADO REDOX MITOCONDRIAL

A enzima 3-hidroxi-butirato desidrogenase (HBD) está localizada somente no compartimento mitocondrial da célula hepática, onde catalisa a seguinte reação:



Como esta enzima é muito ativa no fígado, aceita-se que a reação acima está em equilíbrio. Portanto, a seguinte equação deve ser correta:

$$K_{\text{HBD}} = [\text{Acetoacetato}] \times [\text{NADH}] / [3\text{-Hidroxibutirato} \times \text{NAD}^+]$$

$$\text{Portanto: } [\text{NAD}^+] / [\text{NADH}] = [\text{Acetoacetato}] / [3\text{-Hidroxibutirato}] \times 1/K_{\text{HBD}}$$

Desde que as concentrações de acetoacetato e 3-hidroxibutirato foram medidas no fígado e o valor de K_{HBD} foi medido *in vitro* ($4,93 \times 10^{-2}$) (WILLIAMSON et al, 1967), a razão $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$ no compartimento mitocondrial da célula hepática pode ser calculada.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm E.P.M. acompanhado pelo número de observações (n). A significância estatística foi calculada de acordo com o teste t de Student, obedecendo aos níveis de significância de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da Isquemia Hepática na sobrevivência dos ratos

Neste estudo, os animais do grupo experimental foram submetidos a uma hora de isquemia hepática normotérmica, enquanto os do grupo controle foram submetidos a operação do mesmo porte, mas sem isquemia hepática.. Ambos os grupos foram estudados nos seguintes períodos de tempo após a cirurgia: 0, 1, 6 e 24 horas. Após 0, 1 e 6 horas de revascularização, a mortalidade foi zero em ambos os grupos. Porém, o grupo de 24h submetido a isquemia hepática apresentou sobrevivência de somente 43%, necessitando de reposição de animais para conclusão do estudo. Os animais do grupo controle evoluíram sem nenhum óbito em todos os períodos estudados . Pelo exposto, pode-se concluir que provavelmente a causa “mortis” está relacionada à lesão isquêmica do fígado, já que os animais do grupo controle sobreviveram por 24 horas em 100% dos casos.

4.2. Alterações com o tempo na concentração sanguínea de lactato, piruvato e glicose

4.2.1. Lactato sanguíneo

Uma hora de isquemia hepática normotérmica não alterou

significativamente o lactato sanguíneo, quando comparado com os valores dos animais do grupo controle. No entanto, nota-se nos tempos 0 e 1h, uma tendência de elevação do lactato nos animais isquemiados que retorna a valores similares ao controle após 6 e 24h . Analisando-se isoladamente o comportamento do grupo controle nos diversos tempos estudados, foi observado elevação na concentração de lactato no tempo 1h quando comparada com o tempo inicial de 0h ($p < 0,05$). Por outro lado, observando-se somente o grupo submetido a isquemia hepática, nota-se também aumento na concentração do lactato no tempo 1h em relação ao tempo 0h (1 hora de isquemia hepática sem revascularização) ($p < 0,05$)(Figura 6).

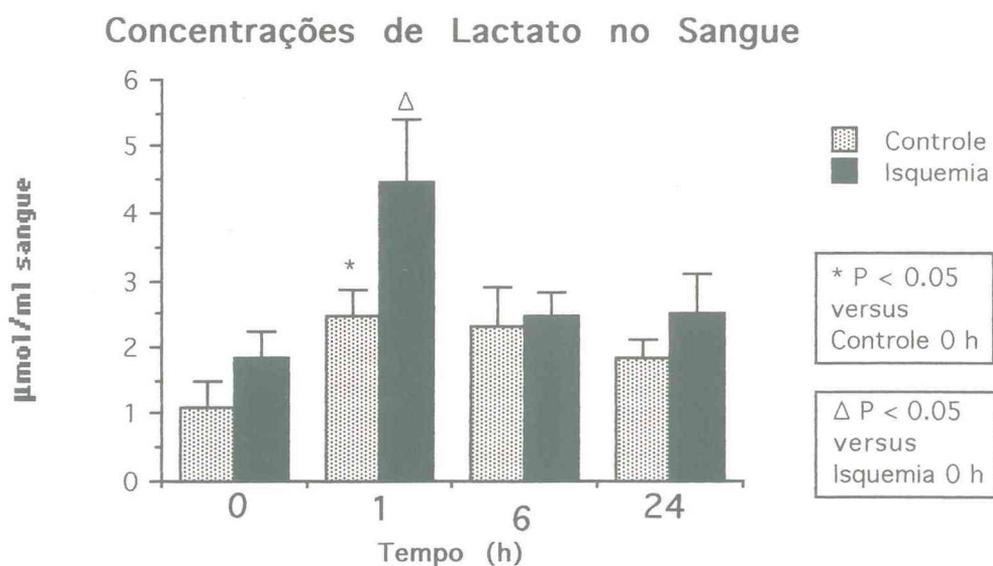


Figura 6

4.2.2. PIRUVATO SANGUÍNEO

As concentrações de piruvato nos animais isquemiados não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o grupo controle em cada intervalo de tempo estudado (0, 1, 6 e 24h). Analisando-se somente o grupo controle, nota-se uma queda nas concentrações de piruvato nos tempos 1h ($p < 0,005$) e 24h ($p < 0,05$), quando comparadas com o tempo inicial de zero h.

Observando-se isoladamente o grupo de animais submetidos a isquemia hepática, nota-se elevação das concentrações deste metabólito com 6h ($p < 0,005$) e 24h ($p < 0,02$), quando comparadas com o tempo 1h (Figura 7).

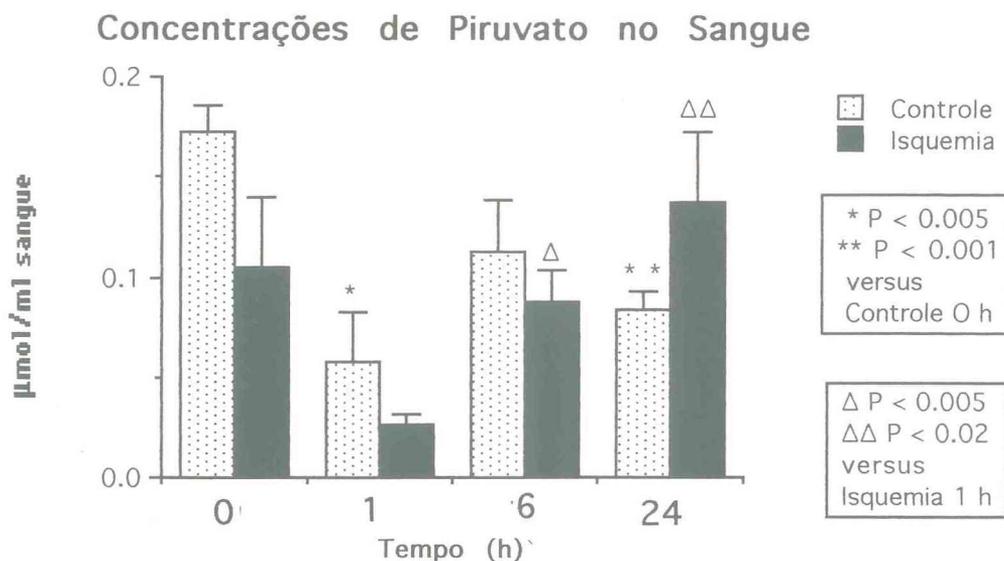


Figura 7

4.2.3. GLICOSE SANGUÍNEA

A isquemia hepática causou elevação significativa da glicemia nos períodos 0h e 1h ($p < 0,05$), quando comparada com os animais do grupo controle nos mesmos intervalos de tempo. Analisando-se somente o comportamento do grupo controle, nota-se uma queda da glicemia nos tempos 6h ($p < 0,01$) e 24h ($p < 0,05$) quando comparados com o tempo inicial de 0h; observa-se ainda diminuição da concentração de glicose no sangue nos tempos 6 e 24h ($p < 0,001$), quando comparadas com o tempo de 1h.

Por outro lado, a análise isolada do grupo de animais submetidos a isquemia hepática, evidencia uma queda progressiva da glicemia nos tempos 6h ($p < 0,001$) e 24h ($p < 0,05$) comparada com os tempos 0 e 1h ; observa-se ainda neste grupo aumento da glicemia no tempo 24h comparado com o tempo 6h ($p < 0,002$) (Figura 8).

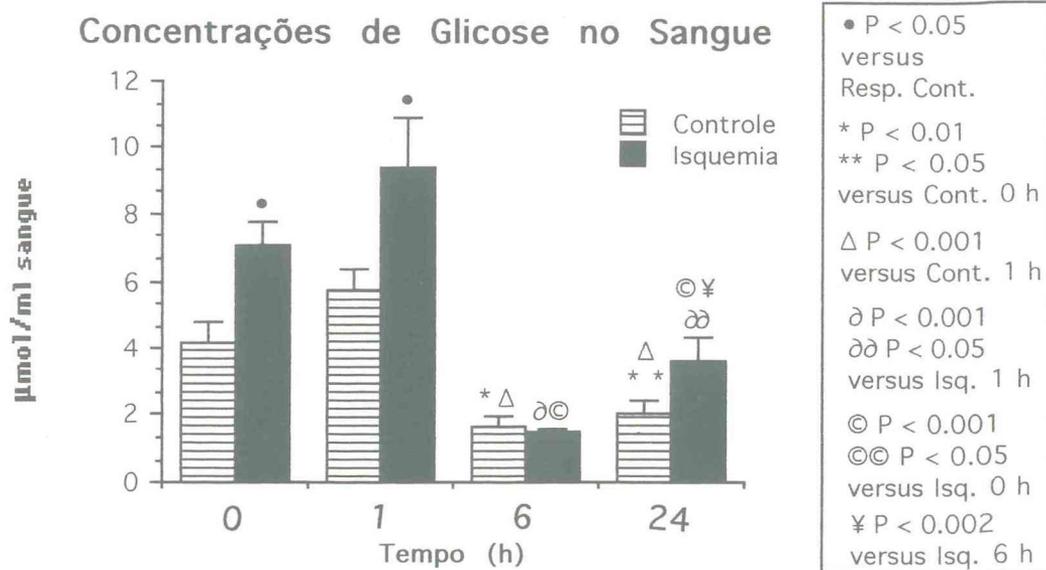


Figura 8

Tabela 1: Alterações com o tempo nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no sangue ($\mu\text{mol/ml}$).

	0 h		1 h		6 h		24 h	
	C	I	C	I	C	I	C	I
Lactato	1.085 \pm 0.423	1.845 \pm 0.380	2.460 \pm 0.399	4.461 \pm 0.937	2.298 \pm 0.597	2.463 \pm 0.359	1.827 \pm 0.277	2.529 \pm 0.580
Piruvato	0.172 \pm 0.013	0.104 \pm 0.036	0.058 \pm 0.025	0.026 \pm 0.006	0.112 \pm 0.026	0.088 \pm 0.015	0.084 \pm 0.009	0.137 \pm 0.036
Glicose	4.143 \pm 0.676	7.039 \pm 0.713	5.738 \pm 0.639	9.425 \pm 1.439	1.680 \pm 0.299	1.477 \pm 0.122	2.076 \pm 0.326	3.596 \pm 0.714

Os resultados são expressos com média \pm EPM de um número de 6 experimentos.

C = Controle

I = Isquemia

4.3. ALTERAÇÕES COM O TEMPO NA CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE ACETOACETATO, 3-HIDROXIBUTIRATO, CORPOS CETÔNICOS E NA RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO

4.3.1. ACETOACETATO NO SANGUE

A concentração de acetoacetato diminuiu significativamente no sangue dos animais isquemiados somente nos tempos 0 h ($p < 0,05$) e 1 h ($p < 0,001$), quando comparada com os animais do grupo controle. Analisando o comportamento de cada um dos dois grupos, de forma isolada, observa-se que no grupo controle ocorreu uma queda da concentração de acetoacetato no tempo 24h, quando comparada com

os tempos 0h ($p < 0,01$) e 1h ($p < 0,05$). No grupo de animais isquemiados, ocorreu uma queda significativa da concentração deste metabólito no tempo 1h comparada com o tempo 0h ($p < 0,005$), seguida de aumento da concentração nos tempos 6h ($p < 0,001$) e 24h ($p < 0,002$) em relação ao tempo de 1h (Figura 9).

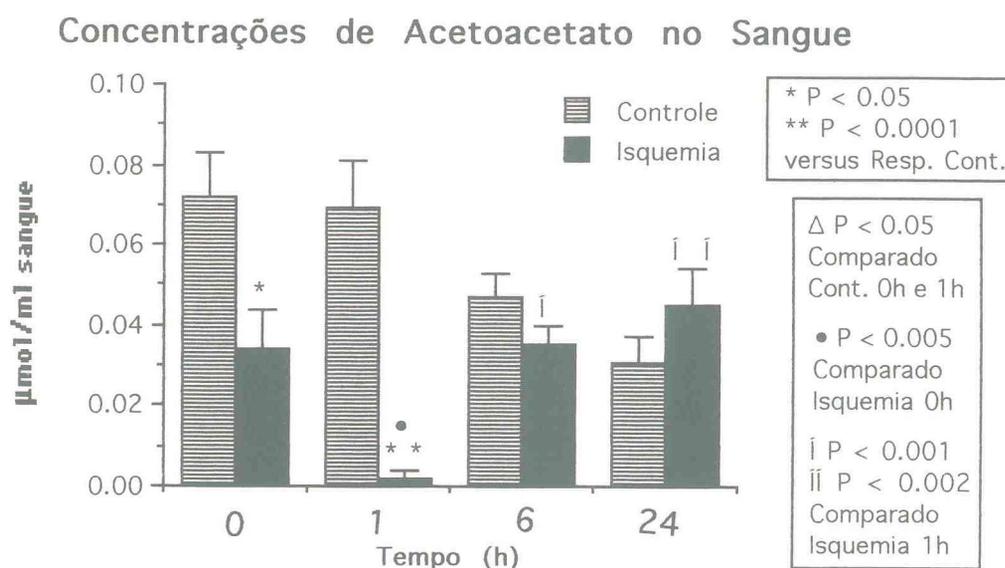


Figura 9

4.3.2. HIDROXIBUTIRATO NO SANGUE

A concentração sanguínea de 3-hidroxibutirato, de forma semelhante ao que aconteceu com acetoacetato, diminuiu significativamente no tempo 1 h ($p < 0,05$) nos animais submetidos a isquemia hepática, quando comparada com o grupo controle.

Analisando isoladamente os dois grupos, observa-se que no grupo controle não houve diferenças significativas nas concentrações deste metabólito nos tempos estudados (0, 1, 6 e 24h); por outro

lado, no grupo de animais isquemiados houve aumento da concentração nos tempos 6h e 24h, quando comparados com os tempos 1 h ($p < 0,005$) e 0 h ($p < 0,05$) (Figura 10).

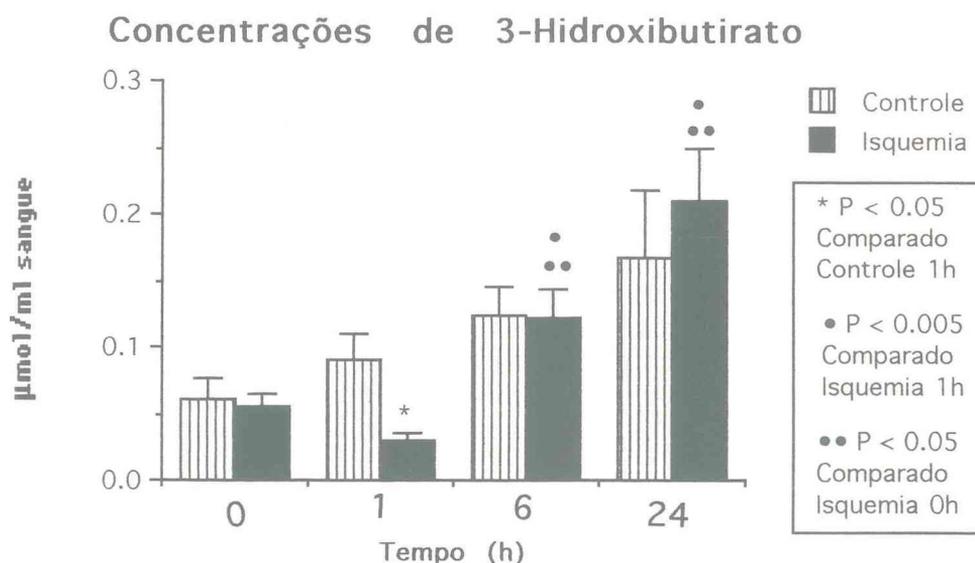


Figura 10

4.3.3. CORPOS CETÔNICOS (3-HIDROXIACETATO + ACETOACETATO) NO SANGUE

A análise da concentração global dos corpos cetônicos no sangue dos animais submetidos a isquemia hepática mostrou a mesma alteração encontrada na medida isolada de acetoacetato e 3-hidroxiacetato, ou seja, uma redução marcante destes metabólitos no tempo 1h quando comparada com os animais do grupo controle ($p < 0,0001$).

A observação isolada dos dois grupos mostrou que no grupo controle não houve diferenças significativas nas concentrações destes metabólitos em todos os tempos estudados (0, 1, 6 e 24h). No entanto, no grupo de animais isquemiados ocorreu uma queda na concentração no tempo 1h em relação ao tempo 0h ($p < 0,05$), seguida de aumento no tempo 6h quando comparado com o tempo 1h ($p < 0,002$); observa-se também neste grupo, aumento da concentração dos corpos cetônicos no tempo 24h comparado com o tempo 1h ($p < 0,02$) e 0h ($p < 0,02$) (Figura 11).

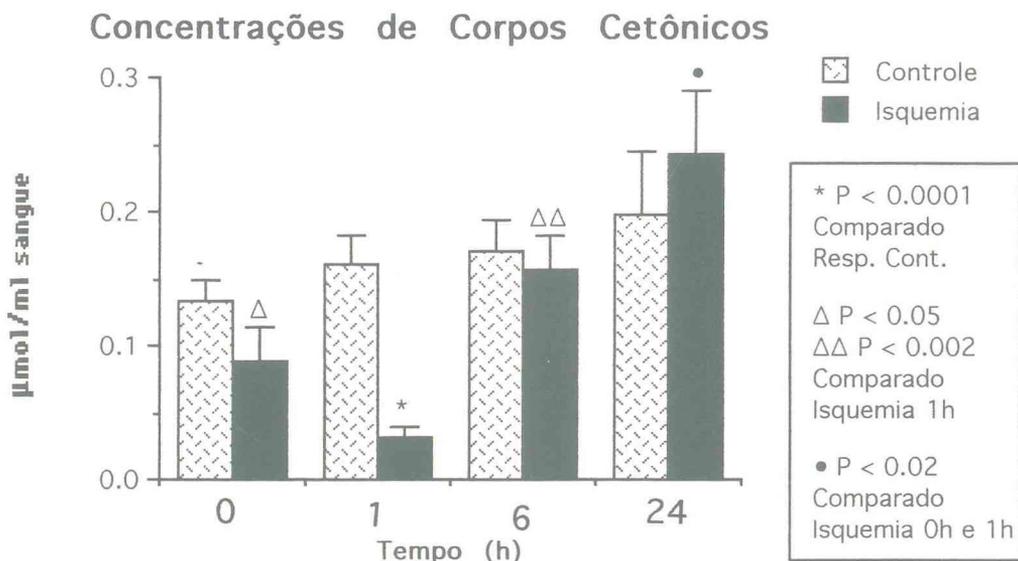


Figura 11

4.3.4. RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO NO SANGUE ARTERIAL

A razão acetoacetato/3-hidroxiacetato foi extremamente baixa nos animais submetidos a isquemia hepática no tempo 1h, quando comparada com a razão do grupo controle no mesmo período de tempo ($p < 0,002$).

Analisando isoladamente os dois grupos (controle e isquemia), observa-se que no grupo controle houve uma queda da razão no tempo 24h comparada com o tempo 1h ($p < 0,05$); por outro lado, no grupo de animais isquemiados ocorreu uma elevação da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no tempo 6h comparada com o tempo 1h ($p < 0,005$). (Figura 12).

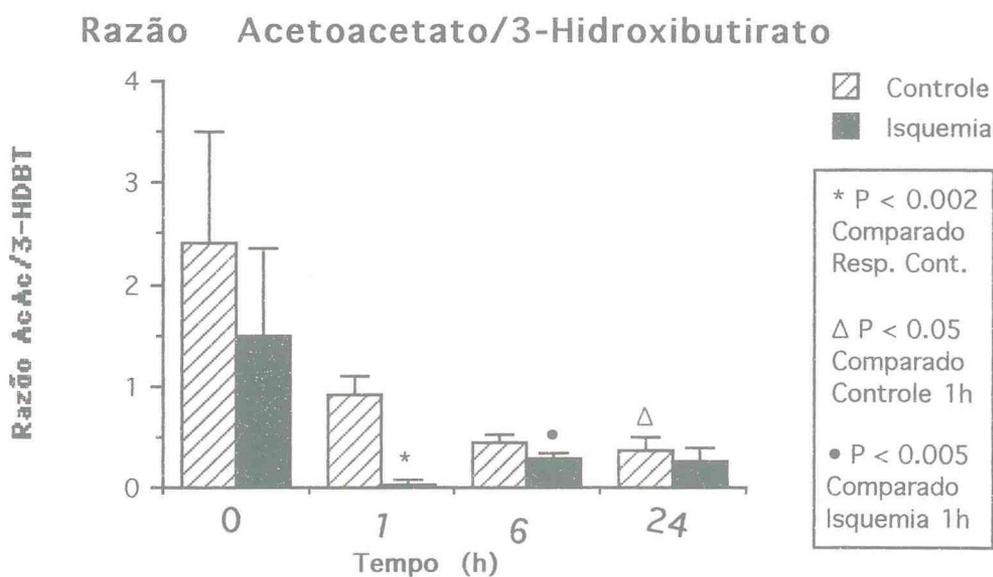


Figura 12

Tabela 2: Alterações com o tempo nas concentrações dos corpos cetônicos no sangue ($\mu\text{mol/ml}$).

	0h		1h		6h		24h	
	C	I	C	I	C	I	C	I
Acetoacetato	0.072 \pm 0.011	0.034 \pm 0.010	0.069 \pm 0.012	0.002 \pm 0.002	0.047 \pm 0.006	0.035 \pm 0.005	0.031 \pm 0.006	0.045 \pm 0.009
Hidroxiabut.	0.060 \pm 0.016	0.055 \pm 0.020	0.091 \pm 0.018	0.030 \pm 0.006	0.123 \pm 0.023	0.122 \pm 0.022	0.166 \pm 0.052	0.209 \pm 0.041
C. cetônicos	0.133 \pm 0.016	0.089 \pm 0.024	0.160 \pm 0.022	0.032 \pm 0.007	0.170 \pm 0.025	0.157 \pm 0.026	0.198 \pm 0.048	0.244 \pm 0.046
ACAC/HDBT	2.406 \pm 1.102	1.488 \pm 0.857	0.905 \pm 0.193	0.035 \pm 0.035	0.436 \pm 0.085	0.294 \pm 0.050	0.365 \pm 0.137	0.267 \pm 0.124

Os resultados são expressos como média \pm EPM de um número de 6 experimentos.

C = Controle

I = Isquemia

ACAC/HDBT = Razão acetoacetato/3-hidroxiacetoacetato

C. cetônicos = Corpos cetônicos

4.4. ALTERAÇÕES COM O TEMPO NA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO, PIRUVATO E GLICOSE NO FÍGADO

4.4.1. LACTATO HEPÁTICO

No fígado dos animais isquemiados, houve elevação significativa da concentração de lactato nos tempos 0h ($p < 0,05$) e 1h ($p < 0,05$), quando comparadas com os animais do grupo controle. Analisando isoladamente os dois grupos, foi observado que no grupo controle houve aumento da concentração deste metabólito no tempo

1h ($p < 0,02$) e 6h ($p < 0,02$) comparada com o tempo 0h; nota-se ainda neste grupo queda na concentração de lactato no tempo 24h em relação aos tempos 6h ($p < 0,05$) e 1h ($p < 0,05$). No grupo de animais isquemiados, ocorreu queda da concentração deste metabólito no tempo 6h comparada com os tempos 1h ($p < 0,05$) e 0h ($p < 0,05$); nota-se também diminuição da concentração no tempo 24h em relação ao tempo 0h ($p < 0,05$). (Figura 13).

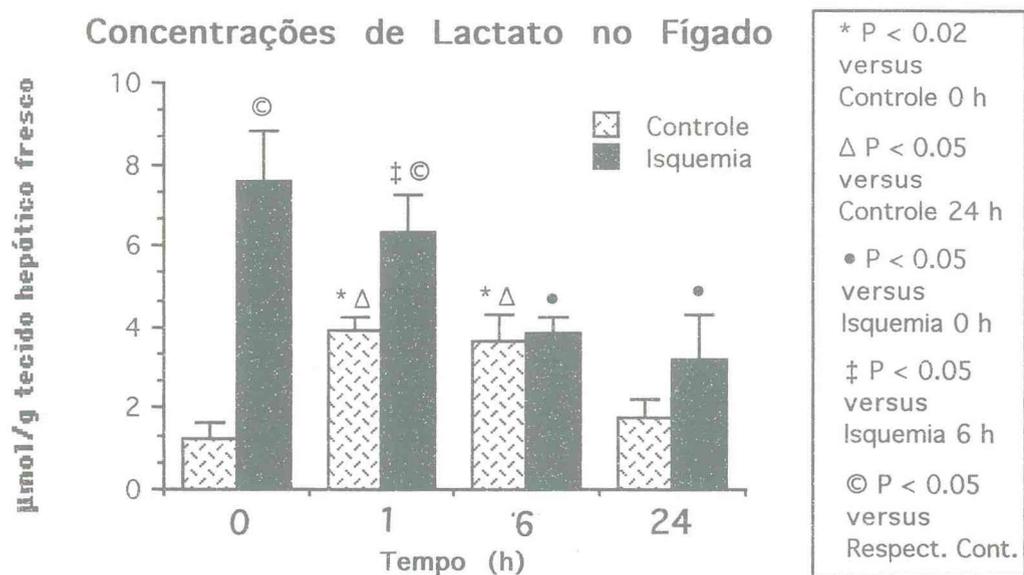


Figura 13

4.4.2. PIRUVATO HEPÁTICO

Como no sangue, os níveis de piruvato hepático dos animais submetidos a isquemia hepática não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os do grupo controle nos tempos 0, 1, 6 e 24h.

Analisando isoladamente os dois grupos (controle e isquemia), foi

observado que no grupo controle houve uma queda na concentração de piruvato no tempo 24h comparada com o tempo 6h ($p < 0,0001$), 1h ($p < 0,01$) e 0h ($p < 0,0001$); por outro lado, no grupo de animais isquemiados não houve diferenças nos intervalos de tempo estudados. (Figura 14).

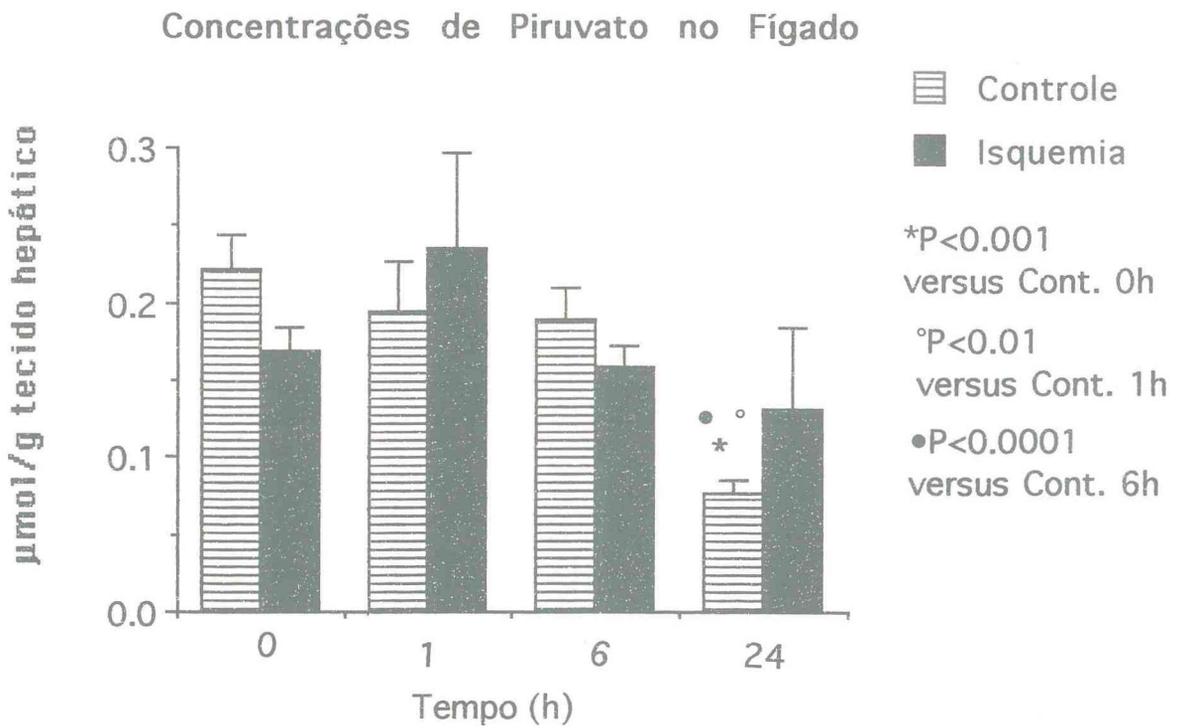


Figura 14

4.4.3. GLICOSE HEPÁTICA

A isquemia hepática não causou elevação da concentração de glicose no fígado nos tempos 1, 6 e 24h. No entanto, no tempo 0h houve aumento significativo da glicose no fígado de animais isquemiados, quando comparado com a taxa deste metabólito no

fígado de animais do grupo controle ($p < 0,0001$).

Analisando isoladamente os dois grupos, foi observado que no grupo controle houve queda da glicose hepática com 6h quando comparada com o tempo 1h ($p < 0,0001$) e 0h ($p < 0,002$); ocorreu ainda elevação da glicose no tempo 1h comparada com o tempo 0h ($p < 0,05$). No grupo de animais isquemiados, houve queda da glicose no tempo 6h comparada com os tempos 1h ($p < 0,0001$) e 0h ($p < 0,0001$); observou-se ainda aumento da glicose no tempo final 24h comparado com o tempo 6h ($p < 0,002$). (Figura 15).

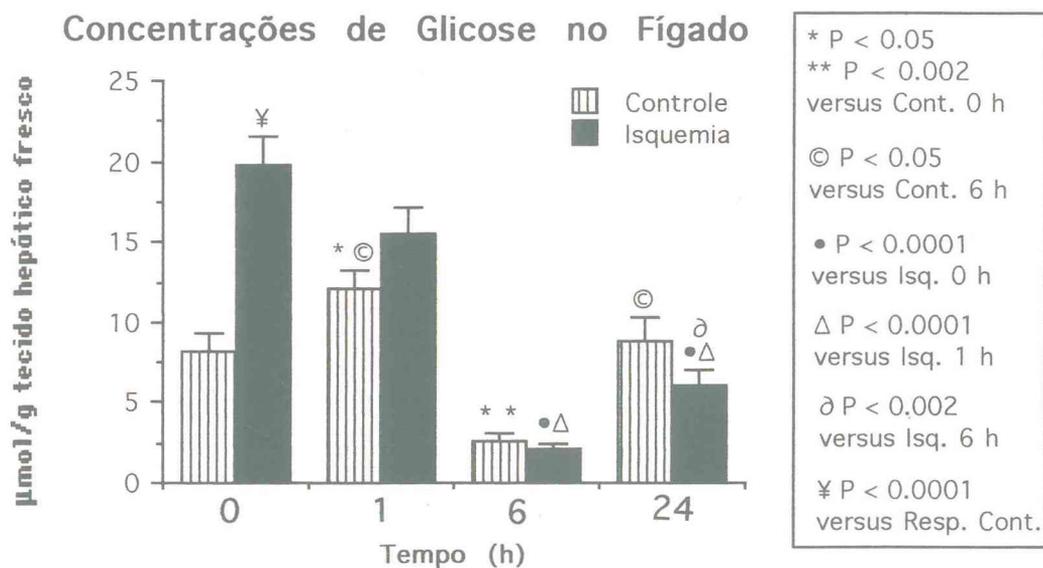


Figura 15

Tabela 3: Alterações com o tempo nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no fígado ($\mu\text{mol/g}$).

	0 h		1 h		6 h		24 h	
	C	I	C	I	C	I	C	I
Lactato	1.260 \pm (5) 0.371	7.584 \pm (6) 1.264	3.920 \pm (6) 0.359	6.343 \pm (6) 0.935	3.652 \pm (6) 0.668	3.861 \pm (6) 0.397	1.744 \pm (6) 0.463	3.203 \pm (6) 1.114
Piruvato	0.221 \pm (6) 0.022	0.168 \pm (6) 0.016	0.195 \pm (6) 0.032	0.236 \pm (6) 0.061	0.190 \pm (6) 0.019	0.158 \pm (6) 0.014	0.076 \pm (6) 0.010	0.131 \pm (6) 0.053
Glicose	8.161 \pm (6) 1.111	19.774 \pm (5) 1.837	12.047 \pm (6) 1.198	15.452 \pm (6) 1.629	2.584 \pm (6) 0.468	2.153 \pm (6) 0.253	8.873 \pm (6) 1.488	6.121 \pm (6) 0.850

Os resultados são expressos como média \pm EPM, com o número de experimentos entre parênteses.

C = Controle

I = Isquemia

4.5. ALTERAÇÕES COM O TEMPO NA CONCENTRAÇÃO HEPÁTICA DE ACETOACETATO, 3-HIDROXIBUTIRATO, CORPOS CETÔNICOS E NA RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO

4.5.1. ACETOACETATO NO FÍGADO

A concentração de acetoacetato só apresentou diferenças no tempo inicial 0h, quando ocorreu queda significativa deste metabólito no fígado de animais submetidos a isquemia hepática em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,002$).

Analisando isoladamente os dois grupos, foi observado que no grupo

controle houve uma queda na concentração de acetoacetato no tempo 6h ($p < 0,05$) e 24h ($p < 0,001$) comparada com o tempo 0h; observou-se ainda neste grupo uma diminuição deste metabólito no tempo 24h em relação aos tempos 6h ($p < 0,002$) e 1h ($p < 0,05$). No grupo experimental (animais isquemiados), ocorreu também diminuição do acetoacetato no tempo 24h comparada com os tempos 6h ($p < 0,05$) e 1h ($p < 0,05$). (Figura 16).

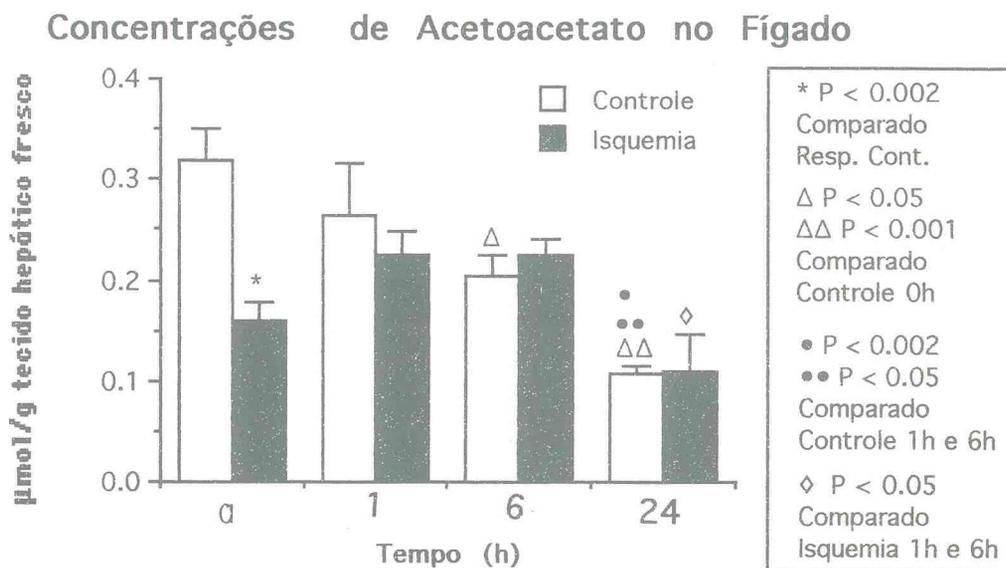


Figura 16

4.5.2. 3-HIDROXIBUTIRATO NO FÍGADO

A concentração hepática de 3- hidroxibutirato não apresentou diferenças significativas nos tempos estudados (0, 1, 6 e 24h), quando comparados os grupos controle e experimental (animais submetidos a uma hora de isquemia hepática).

Analisando isoladamente os dois grupos, foi observado que no grupo

controle não houve diferenças na concentração deste metabólito; no grupo experimental, houve aumento no tempo 6h em relação ao tempo 0h ($p < 0,05$). (Figura 17).

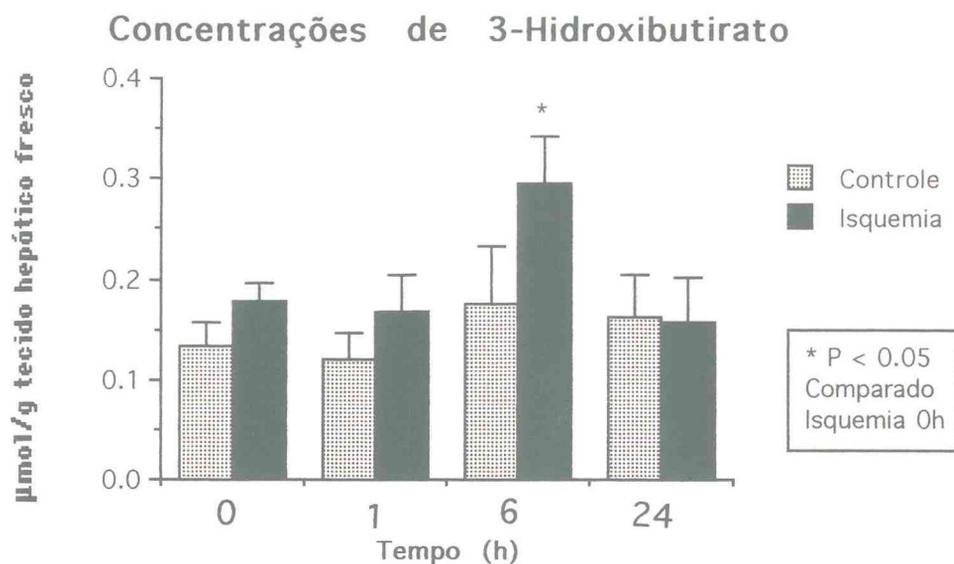


Figura 17

4.5.3. CORPOS CETÔNICOS (ACETOACETATO + 3-HIDROXIBUTIRATO) NO FÍGADO

A concentração dos corpos cetônicos no fígado dos animais submetidos a isquemia hepática foi semelhante ao do grupo controle, em todos os períodos estudados.

Analisando isoladamente os dois grupos, foi observado que no grupo controle houve queda na concentração destes metabólitos no tempo 24h comparada com o tempo 0h ($p < 0,005$). No grupo experimental (isquemia hepática) ocorreu também diminuição na concentração dos corpos cetônicos no tempo 24h, quando comparada com os

tempos 6h ($p < 0,005$) e 1h ($p < 0,05$); houve ainda aumento destes metabólitos no tempo 6h em relação ao tempo 0h ($p < 0,01$). (Figura 18).

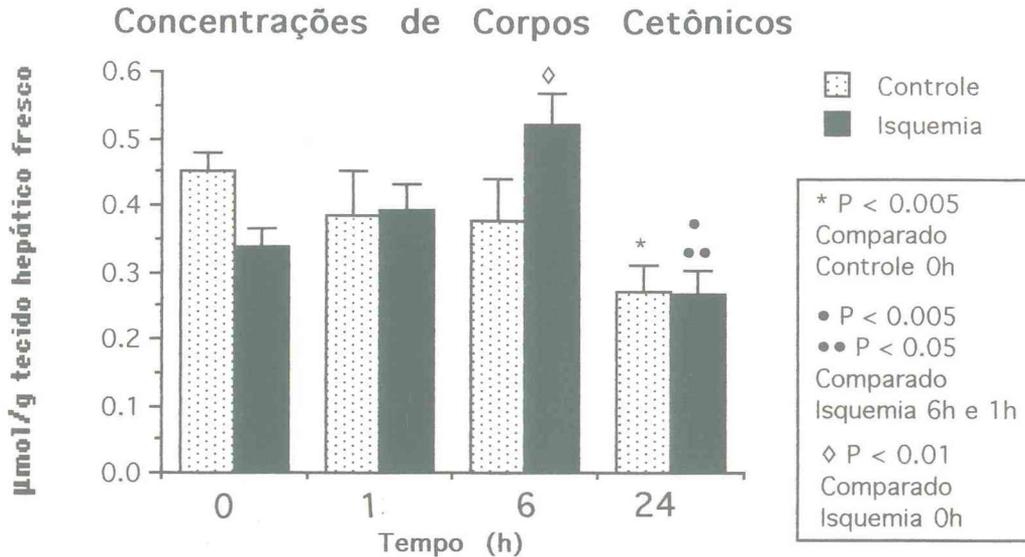


Figura 18

4.5.4. RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO NO FÍGADO

Apesar da tendência de diminuição da razão dos corpos cetônicos no fígado de animais submetidos a isquemia hepática com 1 e 6h, estes resultados só foram significativos no tempo 0h , quando comparados com os animais do grupo controle ($p < 0,02$). Analisando isoladamente os dois grupos, não foram observadas diferenças no grupo controle e experimental. (Figura 19).

Razão Acetoacetato/3-Hidroxibutirato

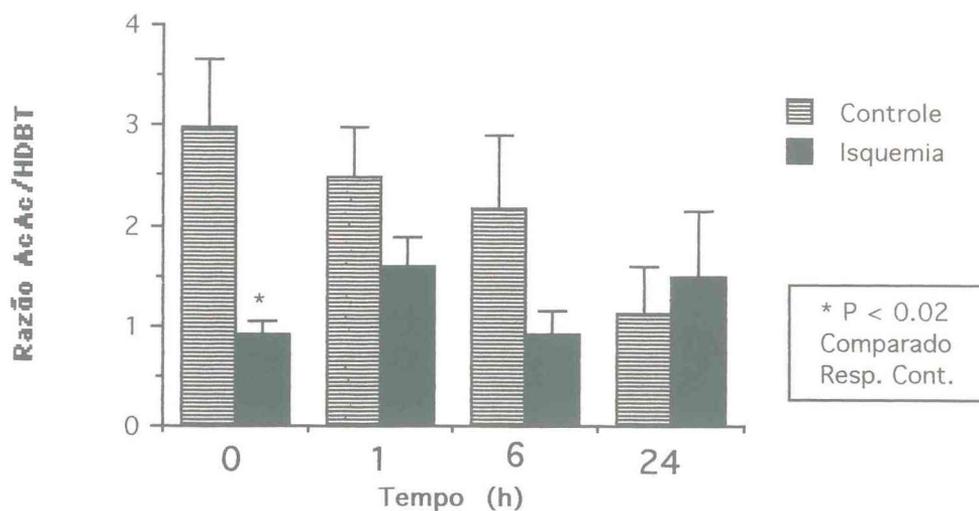


Figura 19

Tabela 4: Alterações com o tempo nas concentrações dos corpos cetônicos no fígado ($\mu\text{mol/g}$).

	0h		1h		6h		24h	
	C	I	C	I	C	I	C	I
Acetoacetato	0.319 \pm 0.032	0.159 \pm 0.019	0.264 \pm 0.052	0.224 \pm 0.024	0.205 \pm 0.019	0.225 \pm 0.015	0.107 \pm 0.008	0.111 \pm 0.035
Hidroxibut.	0.133 \pm 0.024	0.178 \pm 0.017	0.121 \pm 0.026	0.168 \pm 0.036	0.174 \pm 0.059	0.295 \pm 0.048	0.162 \pm 0.041	0.157 \pm 0.045
C. cetônicos	0.452 \pm 0.028	0.338 \pm 0.028	0.384 \pm 0.066	0.392 \pm 0.041	0.378 \pm 0.062	0.520 \pm 0.049	0.269 \pm 0.040	0.268 \pm 0.034
ACAC/HDBT	2.970 \pm 0.682	0.925 \pm 0.119	2.476 \pm 0.498	1.583 \pm 0.301	2.159 \pm 0.756	0.926 \pm 0.219	1.113 \pm 0.464	1.496 \pm 0.646

Os resultados são expressos como média \pm EPM de um número de 6 experimentos.

C = Controle

I = Isquemia

ACAC/HDBT = Razão acetoacetato/3-hidroxiburtiraro

C. cetônicos = Corpos cetônicos

4.6. ALTERAÇÕES NO ESTADO REDOX CITOPLASMÁTICO E MITOCONDRIAL DO FÍGADO EM RESPOSTA A ISQUEMIA HEPÁTICA

4.6.1. ESTADO REDOX CITOPLASMÁTICO DO FIGADO

A isquemia hepática causou queda significativa do potencial redox citoplasmático do fígado somente no tempo 0h (1h de isquemia hepática sem revascularização) ($p < 0,002$).

Analisando isoladamente os dois grupos (controle e isquemia), foi observado que no grupo controle houve queda no potencial redox com 1, 6 e 24h quando comparados com o tempo 0h ($p < 0,005$); já no grupo de animais isquemiados houve aumento do potencial redox no tempo 6h quando comparado com o tempo 0h ($p < 0,05$). (Figura 20).

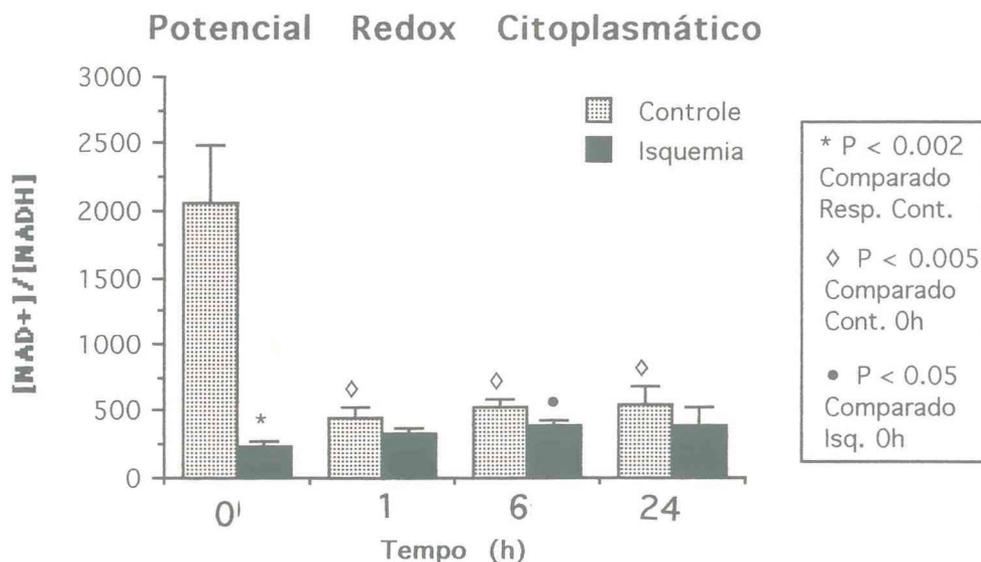


Figura 20

Tabela 5: Alterações com o tempo do estado redox citoplasmático do fígado em animais “sham” operados e isquemiados.

	0 h	1 h	6 h	24 h
Controle	2.053,60 ± (5) 430,55	459,50 ± (6) 72,44	523,00 ± (6) 64,57	554,50 ± (6) 130,07
Isquemia	228,16 ± (6) 40,24	326,66 ± (6) 40,18	386,83 ± (6) 49,08	400,00 ± (6) 135,57

Os resultados são expressos como média ± EPM, com o número de experimentos entre parênteses.

4.6.2. ESTADO REDOX MITOCONDRIAL DO FÍGADO

A isquemia hepática também causou queda significativa do estado redox mitocondrial do fígado somente no tempo 0h ($p < 0,02$). Analisando isoladamente o comportamento dos dois grupos, foi observado que no grupo controle houve tendência de diminuição com o tempo do estado redox, mas sem significado estatístico; já no grupo de animais isquemiados, o estado redox não apresentou diferenças significativas nos tempos estudados (0, 1, 6 e 24h). (Figura 21).

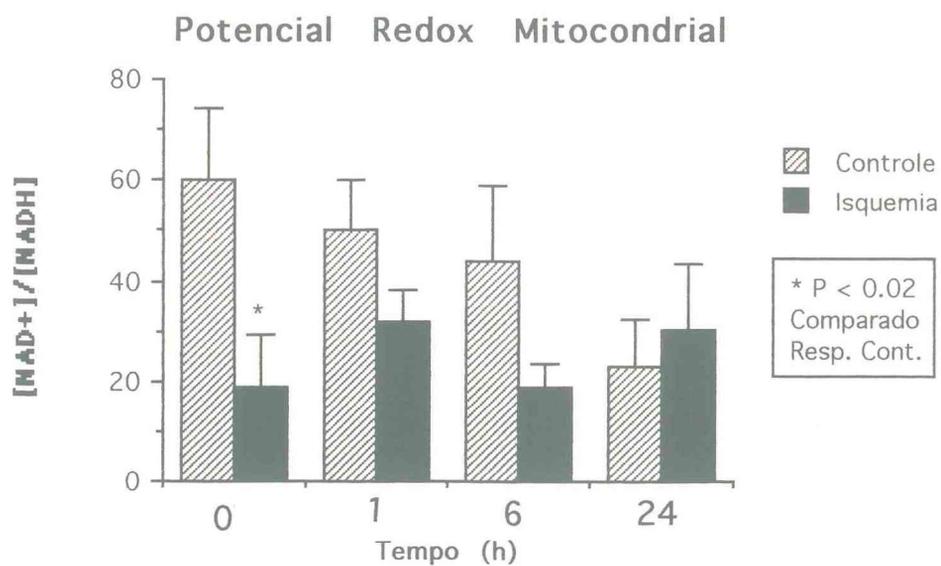


Figura 21

Tabela 6: Alterações com o tempo do estado redox mitocondrial do fígado em animais do grupo controle e isquemiados.

	0h	1h	6h	24h
Controle	60,24 ± (6) 13,92	50,21 ± (6) 10,10	43,77 ± (6) 15,34	22,96 ± (6) 9,40
Isquemia	18,75 ± (6) 10,41	32,10 ± (6) 6,11	18,87 ± (6) 4,44	30,33 ± (5) 13,10

Os resultados são expressos como média ± EPM, com o número de experimentos entre parênteses.

4.7. ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO SANGUE INDUZIDAS POR TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM CICLOSPORINA E TERNATINA

4.7.1. LACTATO SANGUÍNEO

A concentração sanguínea de lactato não apresentou diferenças significativas, do ponto de vista estatístico, após uma hora de isquemia, quando comparados aos grupos de animais em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, comparando-se cada grupo experimental com seu respectivo controle, foi evidenciado elevação do lactato somente nos animais isquemiados tratados com ciclosporina ($P < 0,05$).

A análise dos controles de cada grupo também não evidenciou diferenças entre os animais tratados com ciclosporina, ternatina e os animais operados sem drogas. (Figura 22).

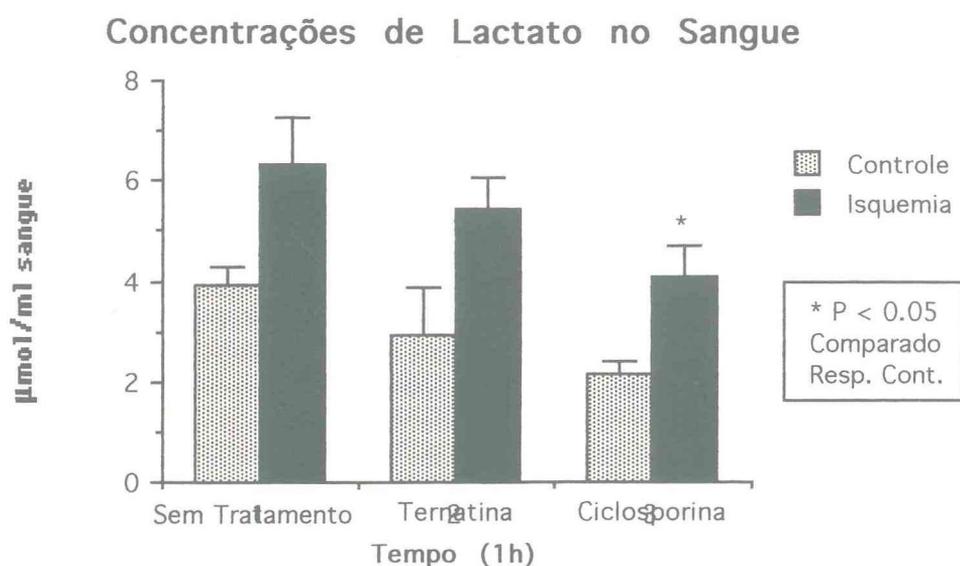


Figura 22

4.7.2. PIRUVATO SANGUÍNEO

A concentração de piruvato no sangue aumentou significativamente nos animais isquemiados e pré-tratados com ciclosporina ($p < 0,001$) e ternatina ($p < 0,01$), quando comparada com a dos animais submetidos a isquemia hepática sem tratamento associado. No entanto, não houve diferenças entre os grupos tratados com ciclosporina e ternatina. Por outro lado, comparando-se cada grupo experimental com seu controle, não foi evidenciado diferenças significativas.

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda da concentração deste metabólito no sangue de animais operados sem drogas, em relação aos tratados com ciclosporina ($p < 0,05$) e ternatina ($p < 0,01$) (Figura 23).

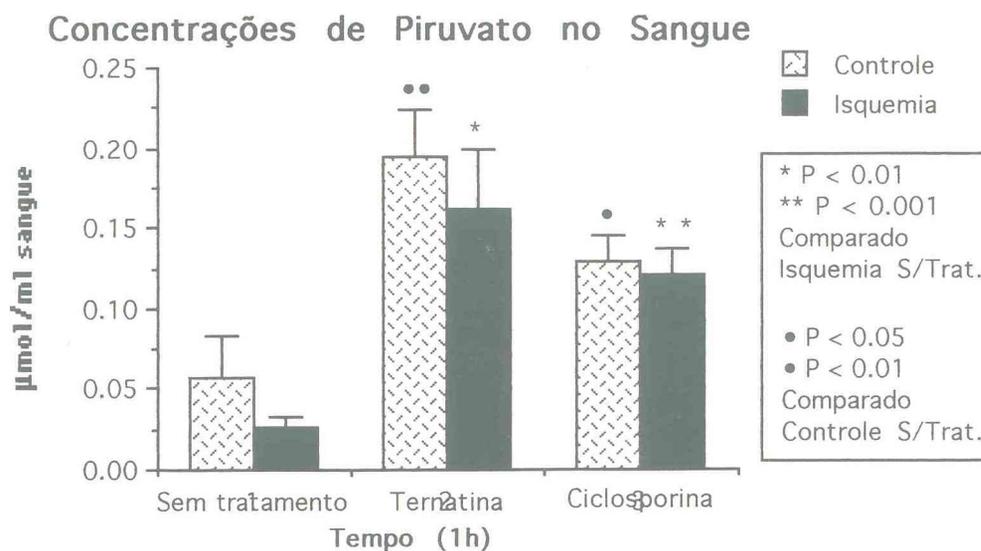


Figura 23

4.7.3. GLICOSE SANGUÍNEA

A concentração sanguínea de glicose não apresentou alterações significativas entre os grupos de animais submetidos somente a isquemia hepática e os animais isquemiados tratados com ciclosporina e ternatina e estudados no tempo 1h. No entanto, comparando-se cada grupo experimental com seu respectivo controle, foi evidenciado elevação da glicemia nos animais isquemiados sem tratamento ($P < 0,05$) e nos isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,0001$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda na concentração deste metabólito no sangue de animais tratados com ternatina, quando comparada com a concentração dos animais tratados com ciclosporina ($p < 0,05$) (Figura 24).

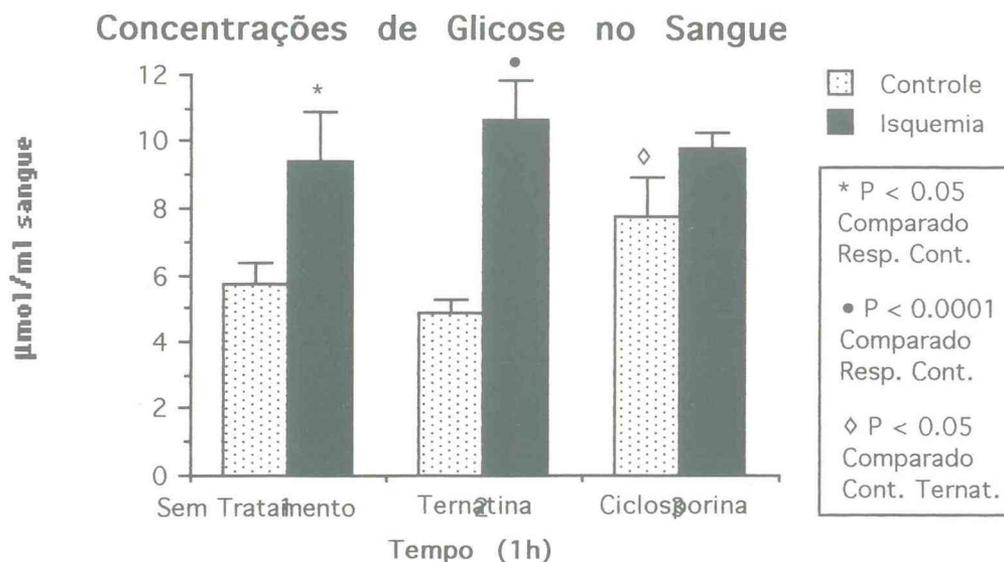


Figura 24

Tabela 7 - Alterações nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no sangue ($\mu\text{mol/ml}$) em resposta ao tratamento com Ciclosporina e Ternatina.

	C	I	C +Cya	I + Cya	C + Tern	I + Tern
Lactato	2.460 \pm 0.399	4.461 \pm 0.937	2.122 \pm 0.276	4.085 \pm 0.619	2.908 \pm 0.964	5.436 \pm 0.613
Piruvato	0.058 \pm 0.025	0.026 \pm 0.006	0.129 \pm 0.017	0.121 \pm 0.016	0.194 \pm 0.030	0.161 \pm 0.039
Glicose	5.738 \pm 0.639	9.425 \pm 1.439	7.789 \pm 1.158	9.769 \pm 0.507	4.850 \pm 0.385	10.690 \pm 1.135

Os resultados são expressos como média \pm EPM de um número de 6 experimentos.

C = Controle

Cya = Ciclosporina

I = Isquemia

Tern = Ternatina

4.7.4. ACETOACETATO SANGUÍNEO

A concentração sanguínea de acetoacetato aumentou significativamente nos animais isquemiados e pré-tratados com ternatina ($p < 0,001$) e ciclosporina ($p < 0,001$), quando comparada com o grupo de animais submetidos a isquemia hepática sem proteção por drogas. Observou-se ainda elevação da concentração de acetoacetato predominantemente no grupo tratado com ternatina em relação ao tratado com ciclosporina ($p < 0,02$). No entanto, comparando-se cada grupo experimental com seu respectivo controle, foi observado queda da concentração deste metabólito nos animais isquemiados sem tratamento ($P < 0,0001$) e nos isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,0001$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou elevação na

concentração deste metabólito no sangue de animais tratados com ternatina, quando comparada com a dos animais tratados com ciclosporina ($p < 0,001$) e com a concentração dos animais operados sem drogas ($p < 0,001$) (Figura 25).

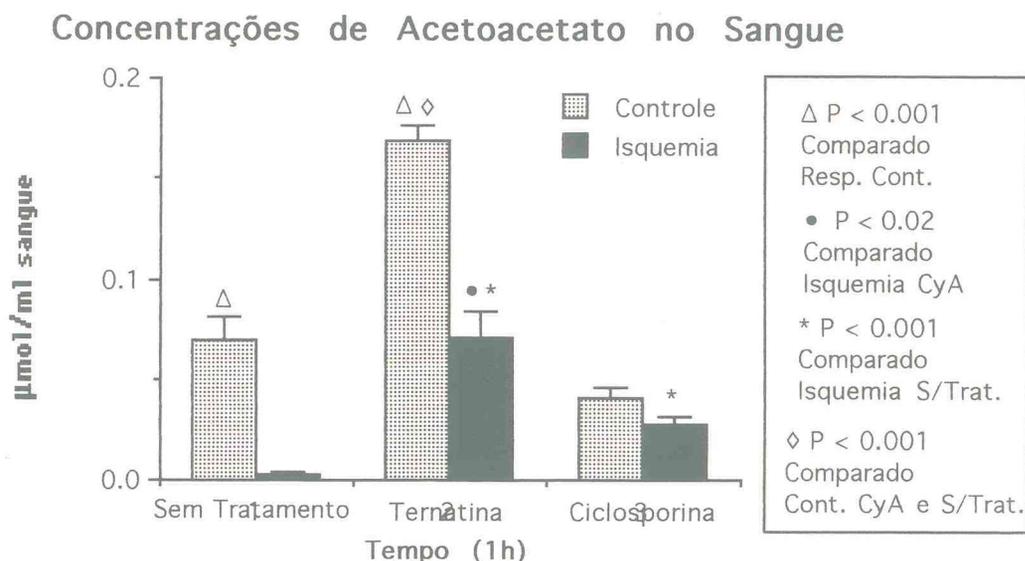


Figura 25

4.7.5. 3-HIDROXIBUTIRATO NO SANGUE

A concentração sanguínea de 3-hidroxiacetato aumentou somente nos animais isquemiados e tratados com ciclosporina em relação aos submetidos a isquemia hepática isolada ($p < 0,01$). No entanto, comparando-se os dois grupos tratados com drogas, foi observado elevação da concentração deste metabólito no grupo tratado com ciclosporina ($p < 0,05$). Por outro lado, comparando-se cada grupo experimental com seu respectivo controle, foi evidenciado queda da concentração nos animais isquemiados sem

tratamento ($P < 0,02$) e nos isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,0001$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou uma elevação na concentração de 3-hidroxiacetato no sangue de animais tratados com ternatina, quando comparada com a concentração dos animais tratados com ciclosporina ($p < 0,05$) e com a dos animais operados sem drogas ($p < 0,05$) (Figura 26).

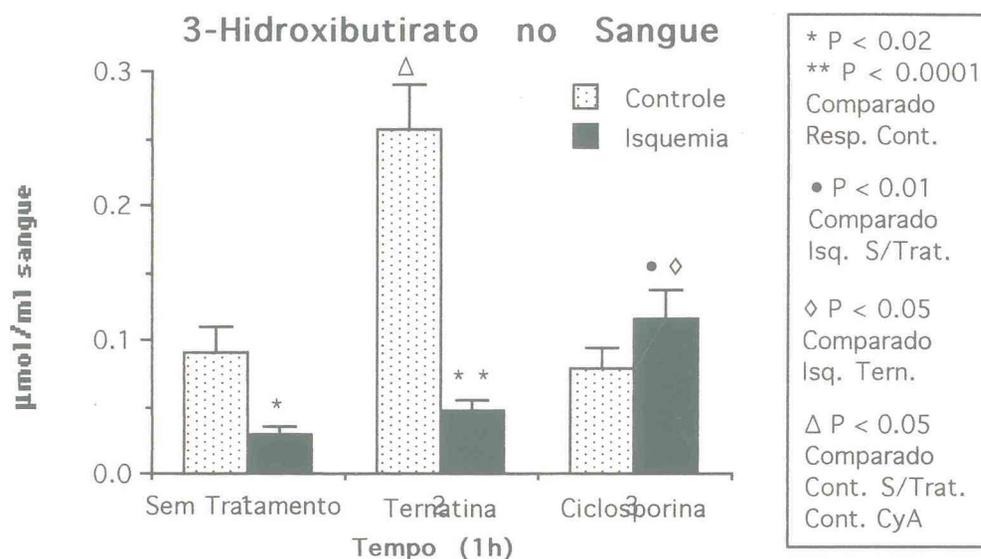


Figura 26

4.7.6. CORPOS CETÔNICOS (ACETOACETATO + 3-HIDROXIACETATO) NO SANGUE

Houve aumento significativo na concentração dos corpos cetônicos nos animais isquemiados e tratados com ternatina ($p < 0,005$) ou ciclosporina ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo

de animais submetidos somente a isquemia hepática. No entanto, não existe diferenças entre os dois grupos isquemiados e tratados com ciclosporina e ternatina. Por outro lado, comparando-se cada grupo experimental com seu controle, foi evidenciado queda dos corpos cetônicos nos animais isquemiados sem tratamento ($P < 0,0001$) e nos isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,0001$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou elevação na concentração dos corpos cetônicos no sangue de animais tratados com ternatina, quando comparada com a concentração dos animais tratados com ciclosporina ($p < 0,001$) e com a dos animais operados sem drogas ($p < 0,001$) (Figura 27)

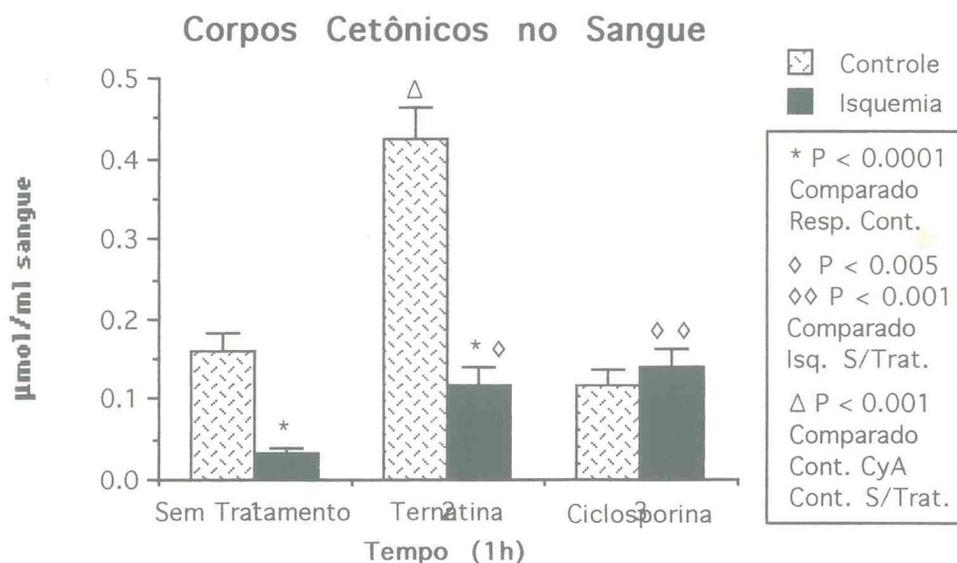


Figura 27

4.7.7. RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO NO SANGUE ARTERIAL

A razão acetoacetato/3-hidroxiacetato encontra-se extremamente baixa no sangue de animais 1h após a revascularização do fígado ($P < 0,002$). No entanto, foi observado que o pré-tratamento com ciclosporina ($P < 0,02$) e, principalmente com ternatina, foi eficaz em elevar nitidamente esta razão ($p < 0,0001$). Por outro lado, comparando-se cada grupo experimental com seu controle, foi evidenciado queda na razão dos corpos cetônicos nos animais isquemiados sem tratamento ($P < 0,002$) e elevação significativa desta razão nos animais isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,01$) e ciclosporina ($P < 0,05$).

A análise dos controles de cada grupo não evidenciou alterações significativas na razão dos corpos cetônicos dos animais tratados com ciclosporina, ternatina e dos animais operados sem drogas (Figura 28)

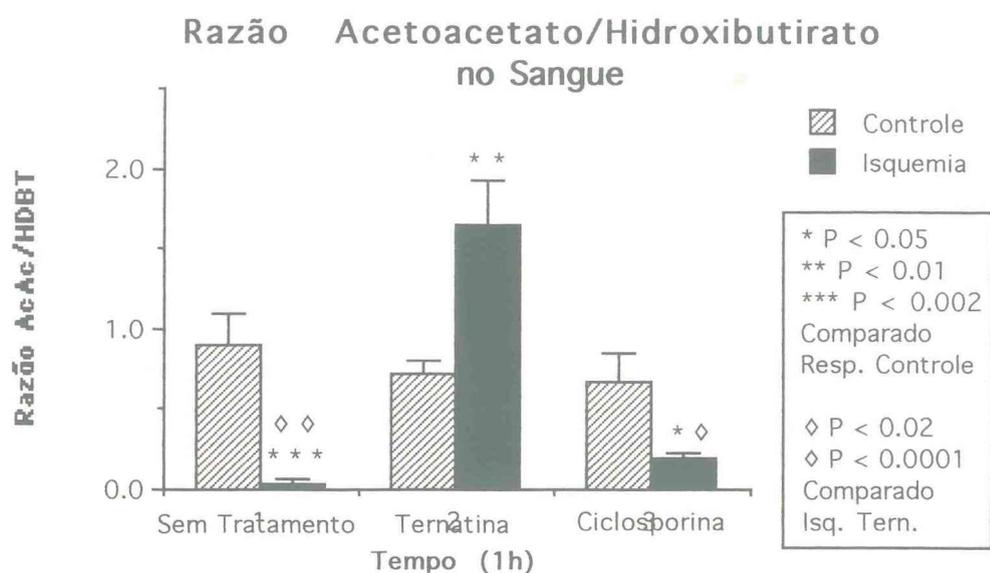


Figura 28

Tabela 8 - Alterações nas concentrações dos corpos cetônicos no sangue ($\mu\text{mol/ml}$) e na razão acetoacetato/3-hidroxitirato em resposta ao tratamento com Ciclosporina e Ternatina.

	C	I	C +Cya	I + Cya	C + Tern	I + Tern
Acetoacetato	0.069 \pm (6) 0.012	0.002 \pm (6) 0.002	0.041 \pm (6) 0.005	0.027 \pm (6) 0.004	0.169 \pm (6) 0.008	0.071 \pm (6) 0.013
Hidroxitirato	0.091 \pm (6) 0.018	0.030 \pm (6) 0.006	0.078 \pm (6) 0.016	0.115 \pm (6) 0.023	0.256 \pm (6) 0.034	0.048 \pm (6) 0.009
C. cetônicos	0.160 \pm (6) 0.022	0.032 \pm (6) 0.007	0.119 \pm (6) 0.018	0.142 \pm (6) 0.020	0.425 \pm (6) 0.040	0.119 \pm (6) 0.021
ACAC/HDBT	0.095 \pm (6) 0.193	0.035 \pm (6) 0.035	0.678 \pm (6) 0.172	0.193 \pm (5) 0.036	0.713 \pm (6) 0.083	1.655 \pm (6) 0.271

Os resultados são expressos como média \pm EPM, com o número de experimentos entre parênteses.

C = Controle

Cya = Ciclosporina

C. cetônicos= Corpos cetônicos

I = Isquemia

Tern = Ternatina

ACAC/HDBT = Razão Acetoacetato/hidroxitirato

4.8. ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO FÍGADO INDUZIDAS POR TRATAMENTO COM CICLOSPORINA E TERNATINA

4.8.1. LACTATO HEPÁTICO

A concentração de lactato no fígado, semelhante ao ocorrido no sangue, não apresentou diferenças nos animais submetidos somente a isquemia hepática em relação a aqueles em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, comparando-se cada grupo experimental com seu respectivo controle, foi observado elevação da concentração de lactato nos animais isquemiados sem tratamento ($P < 0,05$), nos isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,01$) e nos isquemiados tratados com ciclosporina ($P < 0,02$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda do lactato nos animais tratados com ciclosporina em relação aos não tratados ($P < 0,0001$) (Figura 29).

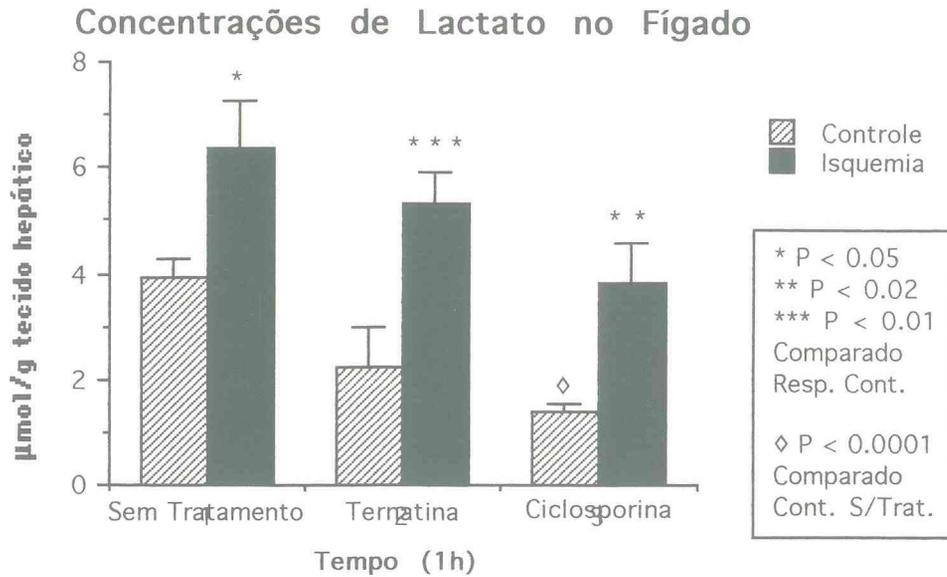


Figura 29

4.8.2. PIRUVATO HEPÁTICO

A concentração de piruvato no fígado, diferente do que ocorreu no sangue, não apresentou diferenças significativas nos animais submetidos somente a isquemia hepática comparados com aqueles em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. Comparando-se ainda cada grupo experimental com seu respectivo controle, não foi observado diferenças significativas nos três grupos estudados.

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda na concentração deste metabólito no fígado de animais tratados com ciclosporina, em relação aos animais operados sem drogas ($p < 0,05$) (Figura 30).

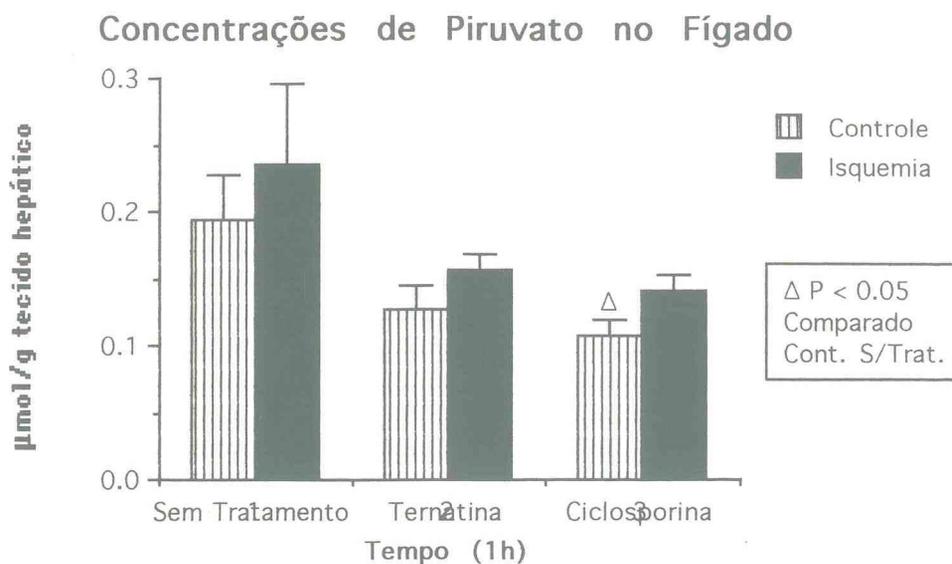


Figura 30

4.8.3. GLICOSE HEPÁTICA

A concentração de glicose no fígado, semelhante ao sangue, não apresentou diferenças significativas entre os animais submetidos somente a isquemia hepática e aqueles em que foi associado tratamento com ternatina ou ciclosporina. No entanto, comparando-se cada grupo experimental com seu controle, foi observado queda da glicose nos animais não isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,002$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda significativa na concentração de glicose nos animais tratados com ternatina em relação aos operados sem drogas ($p < 0,002$); notou-se ainda aumento do controle ciclosporina comparado com controle ternatina (Figura 31).

Concentrações de Glicose no Fígado

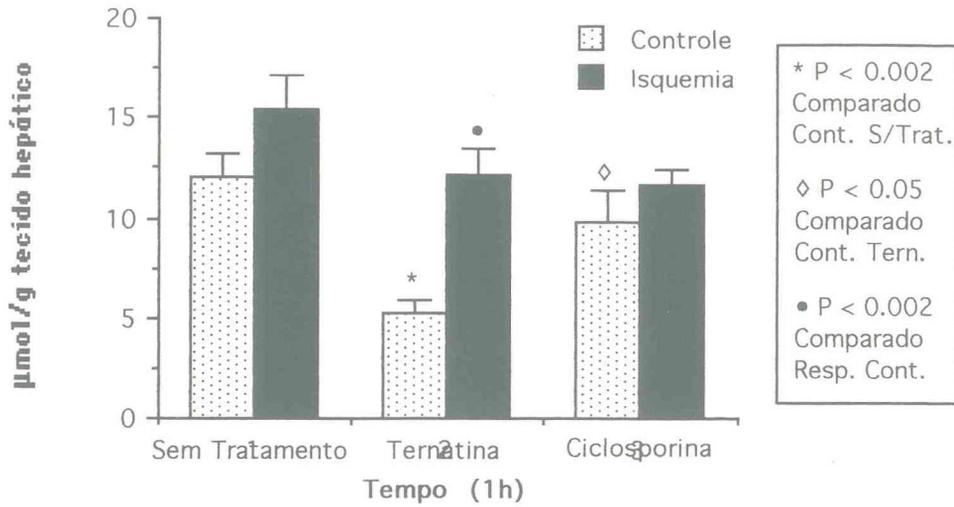


Figura 31

Tabela 9- Alterações nas concentrações de lactato, piruvato e glicose no fígado (µmol/g) em resposta ao tratamento com Ciclosporina e Ternatina.

	C	I	C +Cya	I + Cya	C + Tern	I + Tern
Lactato	3.920 ± 0.359	6.343 ± 0.935	1.395 ± 0.149	3.828 ± 0.748	2.218 ± 0.773	5.333 ± 0.584
Piruvato	0.195 ± 0.032	0.236 ± 0.061	0.108 ± 0.012	0.141 ± 0.012	0.127 ± 0.019	0.157 ± 0.012
Glicose	12.047 ± 1.198	15.452 ± 1.629	9.776 ± 1.660	11.650 ± 0.783	5.176 ± 0.765	12.176 ± 1.260

Os resultados são expressos como média ± EPM de um número de 6 experimentos.

C = Controle

Cya = Ciclosporina

I = Isquemia

Tern = Ternatina

4.8.4. ACETOACETATO HEPÁTICO

A concentração de acetoacetato no fígado de animais submetidos a isquemia hepática e estudados 1h após revascularização, não foi diferente daqueles animais também isquemiados em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, observando-se os animais isquemiados tratados com ciclosporina e ternatina, nota-se queda da concentração no grupo ciclosporina ($P < 0,05$). Por outro lado, comparando-se cada grupo experimental com seu controle, não foi encontrado diferenças significativas.

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda na concentração deste metabólito nos animais tratados com ciclosporina, em relação aos tratados com ternatina ($p < 0,05$) (Figura 32).

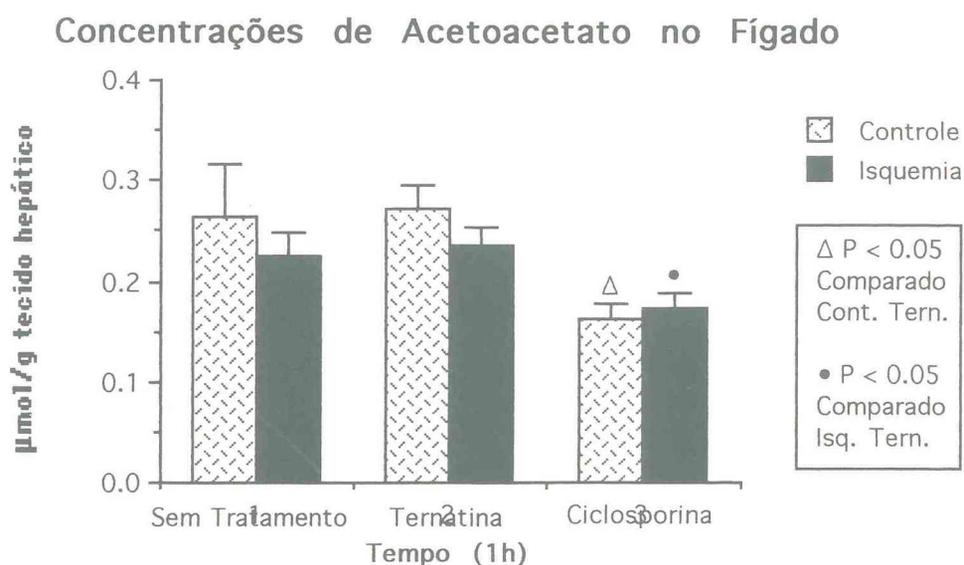


Figura 32

4.8.5. 3-HIDROXIBUTIRATO NO FÍGADO

A concentração de 3-hidroxiacetil-CoA no fígado não apresentou diferenças entre os animais submetidos somente a isquemia hepática e aqueles em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, a comparação de cada grupo experimental com seu controle, mostrou aumento na concentração de 3-hidroxiacetil-CoA nos animais do grupo controle ternatina ($P < 0,01$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou elevação na concentração deste metabólito nos animais tratados com ternatina em relação aos tratados com ciclosporina ($p < 0,01$) e aos operados sem drogas ($p < 0,01$) (Figura 33).

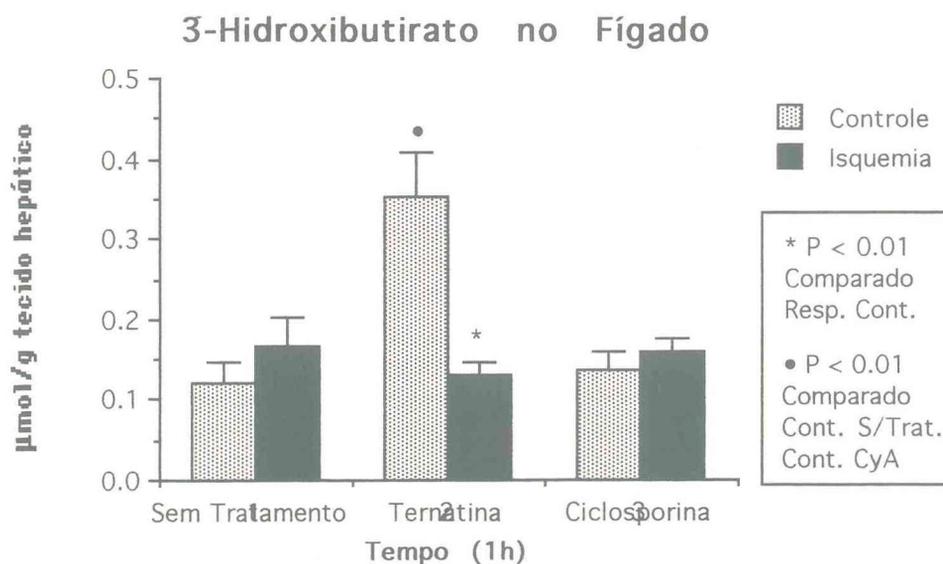


Figura 33

4.8.6. CORPOS CETÔNICOS (ACETOACETATO + 3-HIDROXIBUTIRATO) NO FÍGADO

A concentração dos corpos cetônicos no fígado de animais submetidos a isquemia hepática e estudados 1h após revascularização, não foi diferente daqueles em que a isquemia hepática foi precedida por tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, a comparação entre cada grupo experimental e seu controle, evidenciou elevação dos corpos cetônicos nos animais do grupo controle ternatina ($P < 0,01$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou elevação da concentração dos corpos cetônicos nos animais tratados com ternatina, quando comparados com os tratados com ciclosporina ($p < 0,05$) e com os operados sem drogas ($p < 0,05$) (Figura 34).

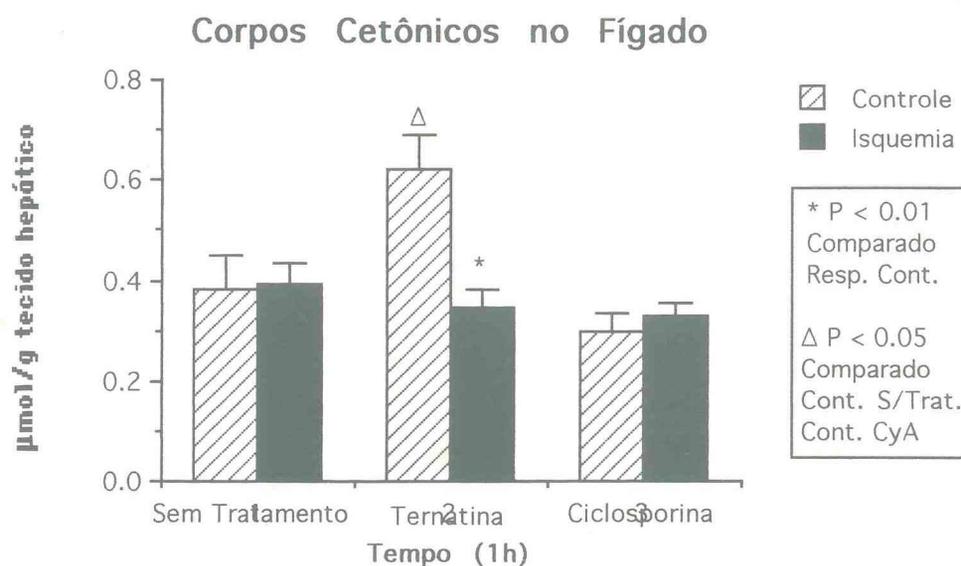


Figura 34

4.8.7. RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO NO FÍGADO

A razão acetoacetato/3-hidroxibutirato não foi diferente entre os animais submetidos somente a isquemia hepática e aqueles em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, comparando-se os grupos isquemiados e tratados com drogas, nota-se que o tratamento com ternatina elevou a razão dos corpos cetônicos ($p < 0,02$). Por outro lado, a comparação entre cada grupo experimental e seu controle, mostrou elevação da razão dos corpos cetônicos nos animais isquemiados tratados com ternatina ($P < 0,05$),

A análise dos controles de cada grupo evidenciou elevação da razão nos animais operados sem drogas, em relação aos tratados com ternatina ($p < 0,05$) e com ciclosporina ($p < 0,05$) (Figura 35).

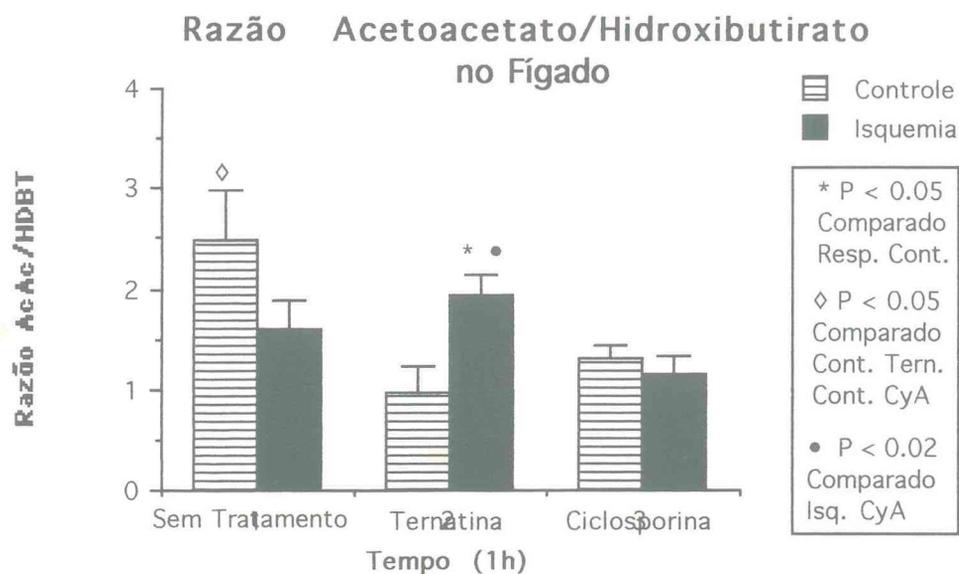


Figura 35

Tabela 10 - Alterações nas concentrações dos corpos cetônicos no fígado ($\mu\text{mol/g}$) e na razão acetoacetato/3-hidroxiacetato em resposta ao tratamento com Ciclosporina e Ternatina.

	C	I	C +Cya	I + Cya	C + Tern	I + Tern
Acetoacetato	0.264 \pm (6) 0.052	0.224 \pm (6) 0.024	0.162 \pm (6) 0.016	0.173 \pm (6) 0.014	0.272 \pm (6) 0.024	0.235 \pm (6) 0.018
Hidroxiacet.	0.121 \pm (6) 0.026	0.168 \pm (6) 0.036	0.137 \pm (6) 0.024	0.159 \pm (6) 0.019	0.353 \pm (6) 0.055	0.130 \pm (6) 0.016
C. cetônicos	0.384 \pm (6) 0.066	0.392 \pm (6) 0.041	0.299 \pm (6) 0.037	0.331 \pm (6) 0.026	0.624 \pm (6) 0.066	0.344 \pm (6) 0.040
ACAC/HDBT	2.476 \pm (6) 0.498	1.583 \pm (6) 0.301	1.297 \pm (6) 0.153	1.163 \pm (6) 0.169	0.960 \pm (6) 0.273	1.929 \pm (5) 0.203

Os resultados são expressos como média \pm EPM, com o número de experimentos entre parênteses.

C = Controle

Cya = Ciclosporina

C. cetônicos = Corpos cetônicos

I = Isquemia

Tern = Ternatina

ACAC/HDBT = Razão acetoacetato/hidroxiacetato

4.8.8. ESTADO REDOX CITOPLASMÁTICO

O estado redox citoplasmático não foi diferente entre os animais submetidos somente a isquemia hepática e aqueles em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, nota-se queda no estado redox no fígado dos animais isquemiados tratados com ternatina ($p < 0,02$) e ciclosporina ($p < 0,005$) quando comparados com os seus respectivos controles

A análise dos controles de cada grupo evidenciou aumento do estado redox nos animais tratados com ciclosporina, quando comparados com os animais operados sem drogas ($p < 0,05$)(Figura 36).

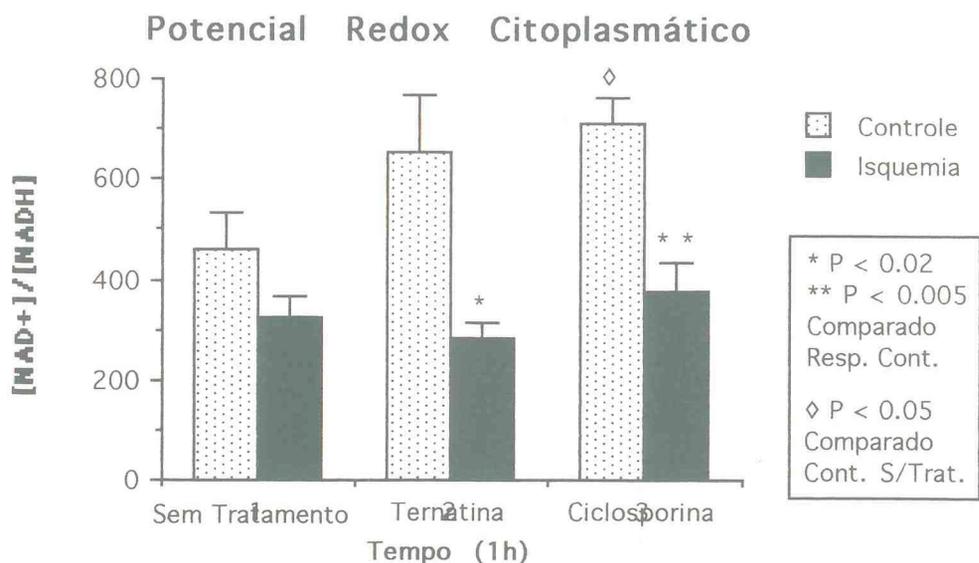


Figura 36

Tabela 11 - Alterações no estado redox citoplasmático do fígado em resposta ao tratamento com Ciclosporina e Ternatina.

C	I	C +Cya	I + Cya	C + Tern	I + Tern
459.50	326.66	710.66	376.33	653.16	281.50
±	±	±	±	±	±
72.44	40.18	55.07	56.30	117.46	33.57

Os resultados são expressos como média ± EPM de um número de 6 experimentos.

C = Controle

Cya = Ciclosporina

I = Isquemia

Tern = Ternatina

4.8.9. ESTADO REDOX MITOCONDRIAL

O estado redox mitocondrial não foi diferente entre os animais submetidos somente a isquemia hepática e aqueles em que foi associado tratamento com ciclosporina ou ternatina. No entanto, quando comparados entre si os grupos submetidos a isquemia e tratados com drogas, nota-se que os animais tratados com ternatina apresentaram aumento significativo do estado redox ($p < 0,02$). Observa-se ainda aumento do estado redox no grupo de animais isquemiados tratados com ternatina quando comparados com o seu controle ($P < 0,05$).

A análise dos controles de cada grupo evidenciou queda do estado redox nos animais tratados com ciclosporina ($p < 0,05$) e ternatina ($p < 0,05$), quando comparados com os operados sem drogas (Figura 37).

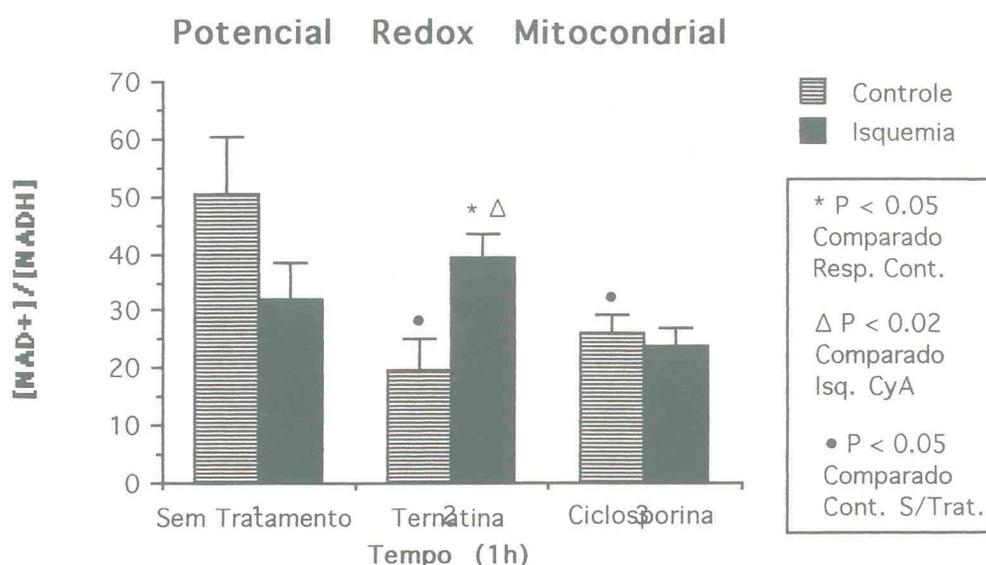


Figura 37

Tabela 12 - Alterações no estado redox mitocondrial do fígado em resposta ao tratamento com Ciclosporina e Ternatina.

C	I	C +Cya	I + Cya	C + Tern	I + Tern
50.21	32.10	26.29	23.57	19.45	39.12
± (6)	± (6)	± (6)	± (6)	± (6)	± (5)
10.10	6.11	3.10	3.43	5.53	4.12

Os resultados são expressos como média ± EPM, com o número de experimentos entre parênteses.

C = Controle

Cya = Ciclosporina

I = Isquemia

Tern = Ternatina

5. DISCUSSÃO

Recentes avanços da anestesia e cirurgia têm propiciado melhores resultados no tratamento de tumores e trauma de fígado, ao lado de maior sobrevida após transplantes (SCHWARTZ et al., 1990, TERBLANCHE et al., 1991, ELIAS et al., 1991, SUC et al., 1992, EMRE et al., 1992). No entanto, a proteção contra a injúria hepática pós-isquêmica permanece como importante problema e várias drogas têm sido recomendadas com este propósito (DELPIN et al., 1975, HIRASAWA et al., 1978, NORDSTROM et al., 1985, MARUBAYASHI et al., 1985, ATALLA et al., 1985, KAWANO et al., 1989, HCNG et al., 1992, KUROKAWA et al., 1992).

O metabolismo hepático durante infecção, trauma e jejum foi abordado por diversos autores e conseqüentemente uma ampla variedade de artigos são encontrados na literatura, propiciando melhor entendimento destas situações (FELIG et al., 1969, CAHILL, 1970, CERRA et al., 1979, ROYLE e KETTLEWELL, 1980, HASSELGREN et al., 1984, ALEXANDER, 1986, VASCONCELOS et al., 1987). Porém, apesar da importância da isquemia hepática em muitas situações já descritas, são poucas as publicações envolvendo metabolismo hepático e regulação da glicose, dos precursores da gliconeogênese e da produção dos corpos cetônicos após injúria isquêmica do fígado.

No presente estudo, serão discutidas alterações nas concentrações hepática e sanguínea de lactato, piruvato, glicose e

corpos cetônicos, na razão acetoacetato/3-hidroxiacetato e no estado redox hepático citoplasmático e mitocondrial após 60 minutos de isquemia hepática normotérmica em ratos, assim como a provável ação hepatoprotetora de drogas como a ciclosporina e tetraciclina, objetivando definir alguns aspectos do metabolismo hepático pós-isquemia que possam contribuir em várias situações clínicas para a prevenção e tratamento da injúria isquêmica do fígado.

5.1. CONCENTRAÇÕES DE LACTATO NO SANGUE E FÍGADO

A única via sintética para a produção do lactato dentro das células é a conversão do piruvato a lactato catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH). O metabolismo do lactato também depende desta reação para a conversão de lactato a piruvato. O NADH é um cofator obrigatório para a reação (GREKIN, 1988).



Em consequência, os níveis de lactato dentro de uma célula estão determinados pelos níveis de piruvato e a relativa prevalência de NADH e NAD⁺ (KREISBERG, 1972). Todas as células são capazes de gerar lactato e liberá-lo na circulação, e todas, exceto as hemácias, células da retina e da medula da glândula suprarenal, que são essencialmente glicolíticas, podem extrair lactato do sangue

para usá-lo no metabolismo. Em condições normais, a produção ocorre principalmente no músculo esquelético, no cérebro, nas hemáceas e na pele.

O fígado e o rim são os principais responsáveis pela eliminação de lactato. Ambos os órgãos utilizam lactato convertendo-o a piruvato através da LDH. Em seguida, o piruvato é metabolizado a glicose (gliconeogênese) ou através do Ciclo de Krebs a ATP, CO_2 e H_2O . Dos dois órgãos, o fígado tem o papel mais importante. A geração de lactato nas hemáceas, músculo esquelético, cérebro e pele, com posterior gliconeogênese pelo fígado tem sido denominado Ciclo de Cori e é útil como mecanismo para manutenção da oferta de energia a órgãos que requerem glicose durante os estados de jejum (WATERHOUSE e KEILSON, 1969)..

Quando alguns tecidos animais precisam funcionar anaerobicamente, o piruvato formado da glicólise não pode ser oxidado devido a falta de oxigênio, sendo então reduzido a lactato. Este processo é chamado de glicólise anaeróbica e é uma importante fonte de ATP (LEHNINGER, 1984).

O ritmo de liberação de lactato dos tecidos para a corrente sanguínea depende da velocidade de formação deste metabólito a nível tissular, a partir do piruvato via reação catalisada pela LDH. Este processo depende portanto das concentrações de piruvato e NADH. Na isquemia, por exemplo, espera-se que a concentração de piruvato esteja aumentada porque o ritmo de glicólise está aumentado, enquanto a oxidação do piruvato está diminuída. Além

disso, a relação NAD^+/NADH durante a isquemia também se encontra baixa. Estes fatores contribuem para o aumento marcante na síntese de lactato durante a isquemia (NEWSHOLME e START¹, 1973).

No presente estudo, a isquemia hepática não alterou significativamente a concentração de lactato no sangue; no entanto, nota-se no tempo 0 e 1h uma tendência de elevação da concentração deste metabólito, que retorna a valores similares aos do grupo controle com 6 e 24h (figura 6). No fígado dos animais submetidos a isquemia hepática, houve realmente elevação significativa da concentração de lactato nos tempos 0h ($p < 0,005$) e 1h ($p < 0,05$), quando comparada com a encontrada em animais do grupo controle (figura 13).

FARKOUH et al. (1971), analisando os efeitos da isquemia hepática em cães, encontraram aumento agudo dos níveis de lactato hepático nas fases precoces de isquemia, seguido de uma elevação gradual até o tempo estudado de 110 minutos. A análise destes resultados evidenciou que nenhum cão sobreviveu quando o nível de lactato era acima de 17 micromoles/g de tecido hepático.

HARRIS et al. (1982), estudando isquemia hepática em porcos durante 90 e 180 minutos com anastomose porto-sistêmica descompressiva, observaram aumento significativo da concentração de lactato no sangue com 1, 5, 10 e 60 minutos após revascularização hepática, e normalização dos níveis deste metabólito com 24h.

TAKI et al. (1987), estudaram transplante hepático em dois grupos de porcos, sendo o primeiro realizado imediatamente após perfusão do enxerto e o segundo após 12 horas de preservação em solução salina gelada. Estes autores observaram que no primeiro grupo a concentração de lactato arterial aumentou gradualmente durante o período de isquemia, atingindo concentração máxima após 30 minutos de revascularização e diminuindo progressivamente até níveis normais com 6 horas. No segundo grupo, o lactato era mantido em altos níveis após revascularização hepática e durante todo o tempo estudado de 24 horas.

Apesar de não haver uma clara linha divisória entre as concentrações sanguíneas normais ou anormais de lactato, considera-se usualmente que concentrações de 1 a 2 $\mu\text{mol/ml}$ de sangue são normais, 5 $\mu\text{mol/ml}$ é uma concentração anormal e acima de 10 $\mu\text{mol/ml}$ são concentrações que podem por em risco a vida. Portanto, concentrações de lactato entre 2 a 5 $\mu\text{mol/ml}$ representam uma faixa cinzenta, a qual pode representar o limite superior da normalidade ou pode indicar valores anormais (NEWSHOLME e LEECH, 1983).

Os resultados do presente estudo vão de encontro aos da literatura que evidenciaram aumento do lactato hepático na fase aguda após revascularização, particularmente nos primeiros minutos (HARRIS et al., 1982). No tempo 0h (imediatamente após 60 minutos de isquemia hepática sem revascularização), cerca de 30% do fígado (lobos lateral direito e caudado) permaneceu perfundido e

portanto funcionando, podendo desta forma metabolizar o lactato e evitar o seu acúmulo na circulação sanguínea. Isto pode explicar a ausência de hiperlactacemia neste tempo estudado.

No presente estudo, onde foi observado elevação precoce e significativa da concentração de lactato hepático induzida por isquemia, parece ter ocorrido pronunciado grau de metabolismo anaeróbico no fígado durante este período. A tendência dos níveis hepáticos de lactato caírem com o tempo, pode indicar recuperação progressiva dos hepatócitos quando o fluxo sanguíneo e o oxigênio são restaurados.

É possível, que o acúmulo progressivo de lactato no fígado durante a isquemia hepática, possa ser um dos fatores responsáveis por dano celular irreversível, visto que nos experimentos de FARKOUH et al., (1971), nenhum cão sobreviveu quando os níveis deste metabólito eram superiores a 17 micromoles/g de tecido hepático. Apesar do aumento da produção de lactato poder produzir acidose metabólica, não se sabe por quais mecanismos o excesso de lactato possa lesar a célula hepática. Estes autores sugeriram, que a redução do pH pode causar interferências com reações metabólicas sensíveis a uma diminuição no pH e até mesmo inibir a glicólise, única fonte de energia para o órgão anóxico.

5.2. CONCENTRAÇÕES DE PIRUVATO NO SANGUE E FÍGADO

O piruvato é o metabólito central do metabolismo dos carboidratos e lipídios. É o produto final básico da via glicolítica, uma série de reações que convertem 1 mol de glicose em 2 moles de piruvato, produzindo 2 moles de ATP. Todas estas reações tem lugar no citoplasma e não dependem da presença de oxigênio.

O piruvato também é formado por desaminação da alanina no fígado e a glutamina no rim. Apesar de ser uma importante fonte da gliconeogênese, principalmente dentro do fígado, o piruvato é quantitativamente mais importante na glicólise.

O piruvato é metabolizado dentro das mitocôndrias por enzimas que requerem oxigênio. A piruvato desidrogenase catalisa a descarboxilação do piruvato a acetilCoA, que logo é oxidada através do Ciclo de Krebs a dióxido de carbono e água. Este processo explica a maior parte do metabolismo do piruvato e produz 18 moles de ATP por mol de piruvato. O piruvato também é metabolizado pela piruvato carboxilase a oxaloacetato, o primeiro passo na conversão de piruvato novamente a glicose. Ambas as vias do metabolismo do piruvato dependem de reações oxidativas mitocondriais e estão muito alteradas em estados de disfunção mitocondrial, como durante a isquemia hepática prolongada (GREKIN, 1988).

No presente estudo, a isquemia hepática não modificou as concentrações de piruvato no fígado em nenhum dos tempos estudados. Como o metabolismo do piruvato depende de reações oxidativas mitocondriais que parecem estar afetadas como

consequência da lesão mitocondrial induzida pela isquemia hepática, seria esperado acúmulo deste metabólito no fígado, fato não ocorrido.

As concentrações de piruvato no sangue também não foram alteradas em nenhum dos tempos estudados. BACKLUND et al. (1965), estudando isquemia hepática em cães não encontraram alterações significativas na concentração de piruvato no sangue, como no presente estudo.

Por outro lado, TAKI et al. (1987), estudando transplante hepático em porcos, observaram elevação rápida da concentração sanguínea de piruvato após isquemia com pico máximo após 30 minutos de revascularização e diminuição progressiva até normalização com 6 horas.

Portanto, é possível que neste estudo tenha havido aumento dos níveis sanguíneos de piruvato precocemente após revascularização em períodos de tempo não estudados, visto que alguns autores relatam como 30 minutos o tempo de concentração máxima de piruvato no sangue (TAKI et al., 1987).

5.3. CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NO SANGUE E FÍGADO

No presente estudo, a isquemia hepática elevou consideravelmente a concentração de glicose no fígado somente no tempo 0h (imediatamente após 60 minutos de isquemia hepática normotérmica sem revascularização). Em situações em que o nível

de energia celular está diminuído, como ocorre no fígado isquêmico, pode haver ativação da fosforilase hepática com resultante incremento da glicogenólise tal como acontece no músculo cardíaco isquêmico (NEWSHOLME e START², 1973). Portanto, a glicogenólise ativada pode explicar a elevação da concentração de glicose hepática que aconteceu nos animais isquemiados no tempo 0h neste estudo. Nos tempos seguintes (1h, 6h e 24h) não houve diferenças na concentração de glicose hepática entre os grupos controle e experimental (isquemia hepática), provavelmente pela reoxigenação do tecido hepático com retorno da respiração celular e consequente diminuição da glicogenólise.

Sem o fígado, um animal morre de hipoglicemia dentro de 4 a 12 horas. Infusão de glicose removerá todos os sintomas de hipoglicemia. No entanto, hiperglicemia é facilmente produzida e o animal sem fígado tem intolerância a glicose (POLLACK et al., 1933).

O fígado é o principal produtor de glicose. Ele responde a hiperglicemia através da captação de glicose e é quantitativamente importante na homeostase da glicose (MADISON et al., 1963). Estudos em cães indicaram que isquemia hepática normotérmica experimental produziu intolerância a glicose. No entanto, se glicose não era administrada, havia queda de seu nível sérico. Estas observações podem ter resultado da diminuição na função homeostática do fígado por depressão da captação ou produção de glicose, da diminuição da perfusão efetiva do fígado reduzindo o

fluxo de sangue sujeito a adição ou remoção de glicose ou da alteração da resposta a insulina (LAMPE et al., 1971).

No presente estudo, a isquemia hepática causou elevação significativa da concentração de glicose sanguínea nos tempos 0h ($p < 0,05$) e 1h ($P < 0,05$). No tempo 0h (imediatamente após 60 minutos de isquemia hepática sem revascularização), a glicemia elevada pode ser resultante do bloqueio da captação de glicose pelo fígado isquêmico, apesar de neste modelo experimental de isquemia hepática seletiva cerca de 30% do parênquima hepático (lobos lateral direito e caudado) permanecerem vascularizados. É também possível especular que fatores humorais liberados do tecido hepático isquêmico via veias supra-hepáticas, possam sinalizar para a glicogenólise nos lobos perfundidos (lateral esquerdo e mediano) via ativação da enzima fosforilase, com consequente liberação de glicose na circulação sistêmica.

No tempo 1h após revascularização, a persistência da glicemia elevada pode refletir a liberação da glicose na circulação proveniente do fígado, visto que no tempo 0h a glicose hepática se encontrava elevada provavelmente por ativação da glicogenólise. É importante salientar, que o principal mecanismo de intolerância a glicose induzido por isquemia hepática, é a depressão da captação da glicose pelo fígado (LAMPE et al., 1971). É provável que mesmo após 1 h de revascularização hepática, a captação de glicose pelo fígado permaneça deprimida, contribuindo para a glicemia elevada encontrada neste período de estudo. A hipoglicemia relativa nos

tempos 6 e 24 h encontrada em ambos os grupos (controle e experimental) talvez seja decorrente da depleção das reservas de glicogênio, juntamente com a manutenção dos animais em jejum. Talvez a gliconeogênese não tenha sido ativada como resultado da lesão isquêmica mesmo no tempo de 24h. É possível também que a redução da massa hepática ocasionada pela hepatectomia dos lobos caudado e lateral direito, possa ter contribuído para esta queda da concentração sérica de glicose.

5.4. CONCENTRAÇÃO DOS CORPOS CETÔNICOS NO SANGUE E FÍGADO

Os corpos cetônicos consistem de acetoacetato, 3-hidroxiacetato e acetona. A acetona não tem importância fisiológica, desde que está presente em pequena quantidade e provavelmente é derivada da descarboxilação espontânea do acetoacetato (NEWSHOLME e START³, 1981). Os corpos cetônicos são sintetizados exclusivamente no fígado a partir da oxidação parcial dos ácidos graxos e podem ser utilizados como fonte de energia pela maioria dos tecidos aeróbios (músculo, cérebro, rim, mama, intestino delgado, etc.), exceto pelo próprio fígado.

A formação dos corpos cetônicos é uma via de "superabundância" (LEHNINGER, 1984). Ela é uma dentre as muitas maneiras que o fígado emprega para distribuir combustíveis para o resto do organismo. Os corpos cetônicos são importantes

combustíveis alternativos a glicose e podem portanto ter uma ação poupadora de proteína endógena. Normalmente, a concentração de corpos cetônicos no sangue é muito pequena, porém no jejum ela pode atingir valores muito altos. Esta condição é conhecida como hipercetonemia adaptativa ao jejum e ocorre quando a velocidade de formação dos corpos cetônicos pelo fígado excede a velocidade de captação e utilização pelos tecidos periféricos.

No presente estudo, a concentração hepática dos corpos cetônicos não foi diferente entre o grupo experimental (animais submetidos a 60 minutos de isquemia hepática normotérmica) e grupo controle (animais operados sem isquemia) em todos os tempos estudados (0h, 1h, 6h e 24h). Tal fato parece sugerir que 60 minutos de isquemia hepática, não alterou a síntese de corpos cetônicos pelo fígado.

No entanto, no sangue ocorreu queda significativa da concentração dos corpos cetônicos no tempo 1h pós-revascularização ($p < 0,001$). No tempo 0h, não houve alterações na concentração destes metabólitos entre o grupo experimental e o grupo controle; isto pode provavelmente ser explicado pela técnica empregada de pinçamento seletivo do pedículo hepático (figura 1), que propiciou, somente neste período de estudo, a permanência de parte do fígado (lobos lateral direito e caudado) com fluxo sanguíneo preservado e conseqüentemente manutenção da síntese dos corpos cetônicos pelo tecido hepático não isquemiado e liberação destes metabólitos na circulação sanguínea.

É provável que a diminuição da concentração dos corpos cetônicos no sangue no tempo 1h no presente estudo, reflita possível redução na síntese destes compostos pelo fígado recém isquemiado, apesar das concentrações hepáticas terem permanecido inalteradas neste tempo estudado. Com o decorrer do tempo (6h e 24h pós-isquemia), as concentrações sanguíneas dos corpos cetônicos, retornaram a valores semelhantes aos encontrados no grupo controle, sugerindo recuperação do hepatócito após injúria isquêmica.

5.5. RAZÃO ACETOACETATO/3-HIDROXIBUTIRATO NO SANGUE E FÍGADO

A razão dos corpos cetônicos é a razão entre acetoacetato e 3-hidroxiacetato no sangue arterial e fígado. Na mitocôndria hepática, acetoacetato sofre redução para 3-hidroxiacetato pela enzima 3-hidroxiacetato desidrogenase localizada na crista mitocondrial (CHAPMAN et al.,1973). O equilíbrio entre a concentração de acetoacetato e 3-hidroxiacetato reflete a razão da forma oxidada livre de nicotinamida adenina nucleotídeo (NAD⁺) para a forma reduzida de nicotinamida adenina nucleotídeo (NADH) na mitocôndria, como mostra a seguinte reação (WILLIAMSON et al.,1967):



Desde que a razão NAD^+/NADH na mitocôndria pode ser calculada como segue: $\text{NAD}^+/\text{NADH} = \text{acetoacetato}/3\text{-hidroxibutirato} \times 1/K$, onde K indica a constante de equilíbrio da enzima 3-hidroxibutirato desidrogenase e desde que a atividade desta enzima é extremamente alta no fígado (LEHNINGER et al., 1960) e que acetoacetato e 3-hidroxibutirato penetram livremente na membrana celular, a razão dos corpos cetônicos no sangue arterial poderia refletir a razão NAD^+/NADH na mitocôndria hepática. A diminuição da razão dos corpos cetônicos poderia indicar progressiva redução na razão NAD^+/NADH mitocondrial. Citrato sintetase, que determina o ritmo de turnover do Ciclo de Krebs, é inibida pela redução do estado redox mitocondrial, e outros processos enzimáticos que requerem NAD^+ na mitocôndria, como os sistemas piruvato desidrogenase e glutamato desidrogenase, são também inibidos. Tal fato dificulta a entrada de aminoácidos plasmáticos e piruvato no Ciclo de Krebs, podendo resultar em um déficit de energia hepática e elevação dos níveis plasmáticos de aminoácidos e lactato (TAKI et al., 1987).

A diminuição do nível de energia hepática foi positivamente correlacionado com a razão dos corpos cetônicos em animais com choque hemorrágico (YAMAMOTO et al., 1980), ictéricos (TANAKA et al., 1979) e hepatectomizados (OZAWA et al., 1982)

No presente estudo, houve queda acentuada da razão dos corpos cetônicos no sangue arterial dos animais submetidos a isquemia hepática no tempo 1h após revascularização ($p < 0,002$). No fígado, houve diminuição significativa da razão dos corpos cetônicos

somente no tempo 0h (imediatamente após 60 minutos de isquemia hepática sem revascularização) ($p < 0,05$). É provável que neste tempo de estudo (0h) em que cerca de 30% do fígado (lobos lateral direito e caudado) permaneceu vascularizado, este tecido hepático remanescente tenha sido responsável pelo balanço e conseqüente normalização da razão dos corpos cetônicos na circulação arterial sistêmica. No entanto, apesar de ter havido tendência de queda da razão dos corpos cetônicos no tempo 1h no fígado, estes resultados não foram significativos

TAKI et al. (1987), estudaram transplante hepático em dois grupos de porcos, sendo o primeiro realizado imediatamente após perfusão do enxerto e o segundo após 12 horas de preservação em solução salina gelada. No primeiro grupo, estes autores encontraram diminuição da razão dos corpos cetônicos imediatamente após pinçamento dos vasos hepáticos, que mantinha-se em níveis baixos durante todo o período de isquemia. Após a revascularização do enxerto, a razão rapidamente aumentou com recuperação dos níveis normais dentro de 30 minutos e manteve-se em níveis relativamente altos durante todo o período estudado de 24 horas. Todos os animais deste grupo sobreviveram por duas semanas após o transplante. No segundo grupo, a razão dos corpos cetônicos também diminuía durante o período de isquemia hepática, como também retornava a níveis normais após revascularização. No entanto, a razão dos corpos cetônicos diminuiu drasticamente após quatro horas de revascularização e todos os

animais morreram dentro de 16 horas, sem elevação da razão dos corpos cetônicos. Estes autores concluíram que a razão dos corpos cetônicos no sangue arterial reflete a viabilidade metabólica do enxerto, desde que o fígado é o único órgão capaz de produzir corpos cetônicos e mediar o balanço entre eles.

A correlação entre a redução e elevação da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial e a sobrevida do enxerto não necessariamente está relacionada ao estado redox mitocondrial hepático, como demonstrado neste estudo. Este fato sugere não haver sempre uma correlação direta entre os níveis sanguíneos e hepáticos dos corpos cetônicos como descritos por outros autores. Portanto, apesar da importância da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial como índice clínico de função hepática, e a sua queda significativa no tempo 1h neste estudo poder sugerir injúria hepática pós-isquêmica, não houve reflexão destes resultados no tecido hepático, que apresentou razões dos corpos cetônicos semelhantes as do grupo controle nos períodos pós-isquemia (1h, 6h, 24h).

5.6. ESTADO REDOX CITOPLASMÁTICO E MITOCONDRIAL

Para manutenção de um nível satisfatório de glicólise no citoplasma e velocidade satisfatória de transporte de elétrons na mitocôndria, uma grande diferença entre as razões $[NAD^+]/[NADH]$ nos dois compartimentos é requerida (NEWSHOLME e START⁴, 1981).

WILLIAMSON et al. (1967), determinaram que o estado redox citoplasmático das células hepáticas do rato é de 725 quando o animal encontrava-se bem alimentado e de 528 quando em jejum. Já o estado redox mitocondrial foi cerca de 7 com alimentação e 5 em jejum.

O efeito trauma, observado no grupo controle deste estudo, causou elevação do estado redox citoplasmático (2053 versus 725) e mitocondrial (60,24 versus 7), quando comparados com os valores encontrados em animais alimentados (WILLIAMSON et al., 1967).

A isquemia hepática normotérmica ocasionou redução significativa de cerca de 900% no estado redox citoplasmático (2053 versus 228) (tabela 5). O mesmo fato ocorreu no estado redox mitocondrial no qual a isquemia provocou redução significativa de cerca de 300% (60 versus 18,75) (tabela 6).

Portanto, a isquemia hepática causou queda tanto do estado redox citoplasmático como do mitocondrial no tempo 0h (imediatamente após 60 minutos de isquemia hepática sem revascularização), reduzindo desta forma a diferença entre estes dois compartimentos e dificultando a formação de ATP. Nos tempos seguintes (1h, 6h e 24h), a revascularização parece ter restaurado o estado redox das células hepáticas, visto que não houve diferenças entre os animais isquemiados e os do grupo controle.

5.7. AÇÕES DA CICLOSPORINA E TERNATINA NA INJÚRIA PÓS-ISQUÊMICA DO FÍGADO

5.7.1. CICLOSPORINA

No presente estudo, foi evidenciado que o tratamento com ciclosporina (10 mg/Kg intraperitoneal por 4 dias antes da indução de isquemia hepática) causou elevação significativa da concentração dos corpos cetônicos e da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial 1h após a reperfusão hepática. Entretanto, tal fato não ocorreu no mesmo tempo estudado no tecido hepático.

A ciclosporina não interferiu com a concentração hepática elevada de lactato e de glicose induzidas pela isquemia. O uso de ciclosporina também não modificou significativamente o estado redox das células hepáticas.

TAKI et al. (1987) enfatizaram que a razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial é um acessível índice clínico de função mitocondrial por refletir esta razão no fígado, sendo um fator prognóstico de função hepática.

KUROKAWA et al. (1992) estudando ratos submetidos a duas horas de isquemia hepática normotérmica e pré-tratados com ciclosporina (10 mg/Kg EV 1h antes da indução de isquemia), observaram que o tratamento com ciclosporina não afetou a disfunção mitocondrial durante a isquemia, nem preveniu a queda

associada da concentração de trifosfato de adenosina (ATP). Porém, o tratamento com ciclosporina acelerou a recuperação da função mitocondrial e das concentrações tissulares de ATP após 60 minutos de reperfusão. Estes resultados indicam que ciclosporina tem potente efeito protetor sobre a lesão pós-isquêmica do fígado.

Outras drogas têm sido descritas na literatura como tendo ação protetora na lesão isquêmica do fígado, por atuarem na disfunção mitocondrial. HIRASAWA et al. (1978) observaram que os níveis celulares hepáticos de ATP e a carga energética estavam significativamente diminuídos durante a isquemia hepática em ratos; no entanto os níveis de ATP eram aumentados e a carga energética retornava ao normal nos animais tratados com ATP-MgCl₂.

MARUBAYASHI et al. (1986) também encontraram diminuição dos níveis de ATP hepático durante isquemia hepática com recuperação lenta após revascularização. No entanto, quando os animais eram pré-tratados com alfa-tocoferol, um antioxidante e removedor de radicais livres, a resíntese de ATP era acelerada.

Restauração do fluxo sanguíneo hepático é de suma importância na recuperação da função mitocondrial. Porém, a ciclosporina não influenciou na recuperação do fluxo sanguíneo hepático em ratos (KUROKAWA et al., 1992). Portanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos da ciclosporina na isquemia hepática não parecem estar relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo hepático.

associada da concentração de trifosfato de adenosina (ATP). Porém, o tratamento com ciclosporina acelerou a recuperação da função mitocondrial e das concentrações tissulares de ATP após 60 minutos de reperfusão. Estes resultados indicam que ciclosporina tem potente efeito protetor sobre a lesão pós-isquêmica do fígado.

Outras drogas têm sido descritas na literatura como tendo ação protetora na lesão isquêmica do fígado, por atuarem na disfunção mitocondrial. HIRASAWA et al. (1978) observaram que os níveis celulares hepáticos de ATP e a carga energética estavam significativamente diminuídos durante a isquemia hepática em ratos; no entanto os níveis de ATP eram aumentados e a carga energética retornava ao normal nos animais tratados com ATP-MgCl₂.

MARUBAYASHI et al. (1986) também encontraram diminuição dos níveis de ATP hepático durante isquemia hepática com recuperação lenta após revascularização. No entanto, quando os animais eram pré-tratados com alfa-tocoferol, um antioxidante e removedor de radicais livres, a resíntese de ATP era acelerada.

Restauração do fluxo sanguíneo hepático é de suma importância na recuperação da função mitocondrial. Porém, a ciclosporina não influenciou na recuperação do fluxo sanguíneo hepático em ratos (KUROKAWA et al., 1992). Portanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos da ciclosporina na isquemia hepática não parecem estar relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo hepático.

Neste estudo, a ciclosporina causou elevação da razão dos corpos cetônicos no sangue e não no tecido hepático. Portanto, o aumento da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue não refletiu a recuperação da função mitocondrial hepática. A ciclosporina não alterou a função mitocondrial tendo como base a razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no fígado. Deste modo, o efeito protetor da ciclosporina na injúria pós-isquêmica do fígado podia estar relacionado ao aumento da capacidade de sintetizar corpos cetônicos, já que houve elevação das concentrações destes metabólitos no sangue no tempo estudado.

A injúria celular irreversível, parece estar relacionada com a abertura dos poros dependentes de cálcio da membrana mitocondrial (CROMPTON et al, 1988). A formação de radicais livres de oxigênio aumenta a abertura destes poros (CROMPTON et al., 1988) e, como se sabe, radicais livres estão amplamente envolvidos na injúria hepática pós-revascularização (NORDSTROM et al., 1985; MARUBAYASHI et al., 1986; PARKS e GRANGER, 1988). A ciclosporina inibe a abertura dos poros cálcio dependentes da membrana mitocondrial (IGBAVBOA et al., 1989). Outro aspecto importante é que células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos são as principais fontes de radicais livres e como a ciclosporina inibe a ativação destas células, é possível que ocorra redução na produção de radicais de oxigênio após reperfusão do fígado.

O efeito benéfico da ciclosporina na lesão pós-isquêmica do

figado, pode estar relacionado a inibição da abertura dos poros cálcio dependentes da membrana interna mitocondrial associado a produção diminuída de radicais livres de oxigênio. Outro aspecto a ser considerado, é a produção aumentada de citocinas em associação com isquemia hepática (COLLETTI et al, 1990) e a deterioração da função hepática causada por TNF (Fator de Necrose Tumoral) (MATTHEWS e NEALE, 1987). Desta forma, é possível que a ciclosporina inibindo a produção de citocinas durante a isquemia, acelere a recuperação do fígado. É pertinente especular que a utilização de ciclosporina em receptores antes do transplante ou o seu uso em soluções de preservação, possa melhorar os resultados de transplante de fígado. Outra possível indicação desta droga seria como medicação pré-operatória em pacientes portadores de neoplasias de fígado e candidatos a hepatectomias com exclusão vascular.

5.7.2. AÇÕES DA TERNATINA NA INJÚRIA PÓS-ISQUÊMICA DO FÍGADO

Alguns flavonóides como cyanidonol, silymarin e quercetin são conhecidos por possuírem propriedades de removedores de radicais livres de oxigênio, sendo capazes de inibir a peroxidação lipídica (KAPPUS et al., 1977, VIDELA et al., 1981, VALENZUELA et al., 1985). Há referências, que os flavonóides promovem inibição de diversas enzimas, tais como lipoxigenase, cicloxigenase e xantina oxidase (HAVSTEEN, 1983). Quanto a ternatina, flavonóide isolado de Egletes viscosa Less., recentemente foi demonstrado ter ação hepatoprotetora contra toxicidade hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) que envolve radicais livres de oxigênio e peroxidação lipídica (RAO et al., 1993). No entanto, não há referências sobre a ação da ternatina na injúria pós-isquêmica do fígado.

No presente estudo, o tratamento com ternatina aumentou as concentrações de piruvato no sangue tanto nos animais do grupo controle como nos animais do grupo experimental (isquemia hepática), parecendo ter esta droga ação sobre este metabólito independente da isquemia. Por outro lado, a ternatina não causou alterações nas concentrações hepáticas de piruvato.

No fígado, o tratamento com ternatina não interferiu com o aumento da concentração de lactato induzido por isquemia.

A ternatina causou diminuição da concentração de glicose hepática

nos animais do grupo controle. Entretanto, não reverteu a elevada concentração deste metabólito no tecido hepático isquemiado.

A ternatina causou elevação das concentrações dos corpos cetônicos tanto no sangue como no fígado dos animais do grupo controle. Isto dá suporte a idéia de que esta droga venha a ter uma ação direta estimulando a cetogênese..

Neste estudo, houve aumento significativo da concentração dos corpos cetônicos e da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial dos animais submetidos a isquemia hepática e pré-tratados com ternatina, quando comparados com os animais isquemiados sem tratamento associado. No entanto, estas diferenças não foram encontradas no tecido hepático. Estes resultados sugerem que a ternatina parece ter atuado no fígado isquêmico estimulando a cetogênese e promovendo a restauração desta função. Como o fígado é o único órgão capaz de produzir corpos cetônicos, é provável que a elevação da concentração destes metabólitos no sangue reflita a recuperação da função hepática.

Como se sabe, radicais livres estão amplamente envolvidos na injúria hepática pós-revascularização (NORDSTROM et., 1985, PARKS e GRANGER, 1988), e a principal consequência do estresse oxidativo é a lesão estrutural das biomoléculas pelas espécies reativas de oxigênio. A liberação destas espécies foi mostrado ser inibida por flavanóides (T'HART et al., 1990). O determinante essencial para inibição do anion superóxido parece ser o grupo OH localizado no anel B da molécula do flavonóide. Desde que ternatina

satisfaz esta necessidade estrutural, presume-se que ela pode inibir a produção de anion superóxido e dessa forma oferecer proteção contra a injúria isquêmica do fígado. São necessários mais estudos experimentais para avaliar a real utilidade desta droga na injúria pós-isquêmica do fígado, já que ela oferece atrativos pelo baixo custo e pouca toxicidade, quando comparada à ciclosporina. O estudo da capacidade de sintetizar glicose e corpos cetônicos, in vitro, através do isolamento de células hepáticas de animais submetidos a isquemia hepática normotérmica e pré-tratados com ternatina, poderia ajudar a esclarecer a real ação hepatoprotetora desta droga na injúria hepática pós-isquêmica.

6. CONCLUSÕES

1. A isquemia hepática ocasionou aumento significativo do lactato no fígado somente nos tempos 0 e 1h, sugerindo pronunciado grau de metabolismo anaeróbico durante o período de isquemia. A tendência dos níveis hepáticos de lactato caírem com o tempo, neste estudo, pode indicar recuperação progressiva dos hepatócitos, quando o fluxo sanguíneo e o oxigênio são restaurados.

2. A isquemia hepática não modificou as concentrações de piruvato no sangue e fígado nos tempos estudados (0, 1, 6 e 24h).

3. A isquemia hepática elevou a concentração de glicose no fígado no tempo 0h, provavelmente por ativação da enzima fosforilase e consequente glicogenólise. No sangue, houve hiperglicemia nos tempos 0 e 1h, provavelmente resultante do bloqueio de captação de glicose pelo fígado isquêmico e pela liberação para circulação da glicose armazenada a partir do glicogênio hepático.

4. A isquemia hepática acarretou queda acentuada da concentração dos corpos cetônicos e da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue no tempo 1h, possivelmente decorrente de redução da síntese destes metabólitos. . Neste mesmo período de tempo, a concentração hepática dos corpos cetônicos permaneceu estável.

5. Houve queda do estado redox citoplasmático e mitocondrial das células hepáticas somente no tempo 0h, sugerindo que a revascularização com normalização da oferta de oxigênio recupera rapidamente o estado redox.

6. O tratamento com Ciclosporina e Ternatina causou elevação significativa da concentração dos corpos cetônicos e da razão acetoacetato/3-hidroxiacetato no sangue arterial após 1h de reperfusão hepática. Tal fato sugere aumento da síntese dos corpos cetônicos, podendo refletir recuperação da função hepática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALEXANDER, J.W. Nutrition and infection: new perspectives for an old problem. Arch. Surg., v. 121, p. 966-972, 1986.
02. ATALLA, S.L., TOLEDO-PEREYRA, L.H., MACKENZIE, G.H., CEDERNA, J.P. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. Transplantation, v. 40, n. 6, p. 584-590, 1985.
03. BACKLUND, W. M., STEVENS, T. J., HAMIT, C. H. F., JORDAN, G. L. Hepatic ischemia in dogs. JAMA, v. 194, n. 10, p. 214-216, dec., 1965.
04. BATTERSBY, C., HICKMAN, R., SAUNDERS, S.J., TERBLANCHE, J. Liver function in the pig: the effects of 30 minutes normothermic ischaemia. Br. J. Surg., v. 61, p. 27-32, 1974.
05. BEHREND, M., RADASCH, H. E., KERSHNER, A. Q. Comparative results of the ligation of the hepatic arteries in animals. Arch. Surg., v. 4, p. 661, 1922.
06. BISMUTH, H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. World J Surg., v. 6, n. 1, p. 3-9, jan., 1982.
07. BOREL, J. F., FEURER, C., GUBLER, H. U. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents actions, v. 6, p. 468-475, 1976.
08. BRUNSCHWIG, A. Observations on the surgical physiology of a human liver pertinent to radical hepatectomy for neoplasm. Câncer, v. 8, p. 459-467, 1955.

09. CAHILL, G.F. Starvation in man. N. Engl. J. Med., v. 82, p. 668-675, 1970.
10. CALNE, R. Y. Transplantation of the liver. Ann. Surg., v. 188, p. 129, 1978.
11. CERRA, F. B., SIEGEL, J. H., BORDER, J. R., WILES, J., McMENAMY, R. R. The hepatic failure of sepsis: cellular versus substrate. Surgery, v. 86, p. 409-422, 1979.
12. CHAPMAN, M. J., MILLER, L.R., ONTRO, J. A. Localization of the enzymes of ketogenesis in rat liver mitochondria. J. Cell. Biol., v. 58, p. 284, 1973.
13. CHAU, A. Y., GOLDBLOOM, V.C., GURD, F.N. Clostridium infection as a cause of death after ligation of the hepatic artery. Arch. Surg., v. 63, p. 390, 1951.
14. CHAUDRY, I. H., CLEMENS, M. G., BAUE, A. E. Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. Arch. Surg., v. 116, p. 1309-1317, 1981.
15. CHAUDRY, I. H., WICHTERMAN, K. A., BAUE, A. E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. Surgery, v. 85, p. 205-211, 1979.
16. COLLETI, L. M., REMICK, D. G., BURTCH, G. D. et al. Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. J. Clin. Invest., v. 85, p.1936, 1990.
17. CROMPTON, M., ELLINGER, H., COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} - dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress.

Biochem. J., v. 255, p. 357, 1988.

18. DELPIN, E. A. S., FIGUEROA, I., LOPEZ, R., VAZQUEZ, J. Protective effect of steroids on liver ischemia. Am. Surg., v. 41, n. 11, p. 683-695, nov., 1975.
- 19 DELVA, E., BARBEROUSSE, J. P., NORDLINGER, B. et al. Hemodynamic and biochemical monitoring during major liver resection with use of hepatic vascular exclusion. Surgery, v. 95, p. 309-318, 1984.
20. DELVA, E., CAMUS, Y., PAUGAM, C. et al. Hemodynamic effects of portal triad clamping in humans. Anesth. Analg., v. 66, p. 864-868, 1987.
21. DELVA, E., CAMUS, Y., NORDLINGER, B. et al. Vascular occlusions for liver resections: operative management and tolerance to hepatic ischemia. Ann. Surg., v. 209, p. 211- 218, 1989.
22. DEWEESE, M. S., LEWIS, C. Partial hepatectomy in the dog. Surgery, v. 30, p. 642-651, 1951.
23. DRAPANAS, T., BECKER, D. R., ALFANO, G. S., POTTER, W. H., STEWART, J. D. Some effects of interrupting hepatic blood flow. Ann. Surg., v. 142, n. 5, p. 831-835, 1955.
24. DUCHINOVA apud RAFFUCI, F. L., MINNEAPOLIS, M. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. Surgery, v. 33, n. 3, p. 342-350, 1953.
25. EMRE, S., SCHWARTZ, M. E., KATZ, E., MILLER, C. M. Liver resection under total vascular isolation. Ann. Surg. , v.217, p. 15-19, 1993.

26. ELIAS, D., DESRUENNES, E., LASSER, P. Prolonged intermittent clamping of the portal triad during hepatectomy. Br. J Surg., v. 78, n. 1, p. 42-44, Jan., 1991.
27. FARKOUH, E., DANIEL, A. M., BEAUDOIN, J. G., MacLEAN, L. D. Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia. Surg. Gynecol. Obstet., p. 832-838, may., 1971.
28. FELIG, P., MARLISS, E., OWEN, O. E., CAHILL, G. F. Amino acid metabolism during prolonged starvation. J. Clin. Invest., v. 48, p. 584-594, 1969.
- 29 FIGUEROA, I., SANTIAGO-DELPIN, E. A. Steroid protection of the liver during experimental ischemia. Surg. Gynecol. Obstet., v. 140, p. 368-370, mar., 1975.
30. FITTS, W. T., SCOTT, R., MACKIE, J. A. Effect of antibiotics on ligation of hepatic artery. Surgery, v.28, p. 458, 1950.
31. FRASER, D., RAPPAPORT, A. M., VUYLSTEKE, C. A., COLWELL, A. R. Effects of ligation of the hepatic artery in dogs. Surgery, v. 30, p. 624-641, 1951.
32. GRANGER, D. N., RUTILI, G., McCORD, J. M. Role of superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology, v. 81, p. 22-29, 1981.
33. GREKIN, R. J. Cetoacidosis, estado hiperosmolar y acidosis láctica. In: KOKKO, J. R., TANNEN, R. L. Líquidos y electrólitos. Buenos Aires: Panamericana, 1988. cap. 17, p. 811-813.

34. HALL, R. R. Hyperkalaemia following temporary occlusion of the portal vein and hepatic artery. Br. J. Surg., v. 59, n. 2, feb., 1972.
35. HARRIS, K. A., WALLACE, A. C., WALL, W. J. Tolerance of the liver to ischemia in the pig. J Surg. Res., v. 33, n. 6, p. 524-530, dec., 1982.
36. HASSELGREN, P. O. Prevention and treatment of ischemia of the liver. Surg. gynecol. obstet., v. 164, p. 187-196, feb., 1987.
37. HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem pharmacol, v, 32, p. 1141-1148, 1983.
38. HIRASAWA, H., CHAUDRY, I. H, BAUE, A. E. Improved hepatic function and survival with adenosine thiphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. Surgery, v. 83, n. 6, p. 655-662, june, 1978.
39. HOHORST apud VASCONCELOS, P. R. L. Hepatic metabolism during sepsis. Oxford: University Oxford, 1987. p. 55, Tese (Doctor of phylosophy).
40. HOLZE apud WILLIAMSON, D. H., LUND, P., KREBS, H. A. The redox state of the free nicotinamid adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem. J, v. 103, p. 514-524, 1967.
41. HONG, R. W., ROUNDS, J. D., HELTON, W. S. et al. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. Ann Surg, v. 215, p.114-119, 1992.

42. HUGGINS, C., POST, J. Experimental subtotal ligation of the arteries supplying the liver. Arch. Surg., v. 35, p. 878-886, 1937.
43. HUGUET, C., GALLOT, D., OFFENSTADT, G. Normothermic complete hepatic vascular exclusion for resection of the liver. N. Engl. J. Med., v. 294, p. 51-52, 1976.
44. HUGUET, C., NODLINGER, B., BLOCH, P., CONARD, J. Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. Arch. Surg., v. 113, p. 1448-1451, dec., 1978.
45. IGBAVBOA, U., ZWIZINSKI, C. W., PFEIFFER, D. R. Release of mitochondrial matrix proteins through a Ca²⁺-requiring, cyclosporin-sensitive pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.161, p. 619, 1989.
46. JABLONSKI, P., HOWDEN, B. O., RAE, D. A. An experimental model for assesment of renal recovery from warm ischaemia. Transplantation, v. 35, p. 198-204, 1983.
47. JAMART, J., and LAMBOTTE, L. Differential effect of swelling and anoxia on kidney function and its consequences on the mechanisms of action of intracellular organ preservation solutions. Transplantation, v. 34, p. 176-182, 1982.
48. JOLLY, P. C., FOSTER, J. F. Hepatic inflow stasis. Surgery, v. 54, p. 45-55, july, 1963.
49. JOSEPH, W. L., FONKALSRUD, E. W., LONGMIRE, W. P. Vasodepressive effects of the venous effluent following canine liver allotransplantation. J. surg. res., v. 8, p. 367-

372, 1968.

50. KAPPUS, H., KIEZKA, H., SCHEULEN, M., REMMER, H. Molecular aspects of catechol and pyrogallol inhibition of liver microsomal lipid peroxidation stimulated by ferrous in - ADP - complexes or by carbon tetrachloride. Naunyn-schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 300, p. 179-187, 1977.
51. KAWANO, K., KIM, Y. I., KAKETANI, K., KOBAYASHI, M. The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats. Transplantation, v. 48, n. 5, p. 759-764, nov., 1989.
52. KIM¹, Y. I., CALNE, R. Y., NAGASUE, N. Cyclosporin A stimulates proliferation of the liver cells after partial hepatectomy in rats. Surg. Gynecol Obstet., v. 166, p. 317-322, april, 1988.
53. KIM², Y. I., SALVINI, P., AUXILIA, F., CALNE, R. Y. Effect of cyclosporin A on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: comparison with standard immunosuppressive agents. Am. J Surg., v. 155, n. 2, p. 245-249, feb., 1988.
54. KREISBERG, R. A. Glucose - lactate interrelations in man. N. Engl. J. Med., v. 287, p. 132-137, 1972.
55. KUROKAWA apud MATTHEWS, N., NEALE, M. L. Studies on the mode of actions of tumor necrosis factor on tumor cells in vitro. In: Pick, E. Lymphokines. New York: Academic, 1987, v. 14, p. 223.
56. KUROKAWA, T., NONAMI, T., HARADA, A. et al. Effects of prostaglandin E₁ on the recovery of ischemia - induced liver

mitochondrial dysfunction in rats with cirrhosis. Scand. J. Gastroenterol., v. 26, p. 269, 1991.

57. KUROKAWA, T., NONAMI, T., KOBAYASHI, H. Inhibition by cyclosporine of the production of superoxide radicals. N. Engl. J. Med., v.19, p. 840, 1992.
58. KUROKAWA, T., KOBAYASHI, H., NONAMI, T. et al. Beneficial effects of cyclosporine on postischemic liver injury in rats. Transplantation, v. 53, n. 2, p. 308-311, feb., 1992.
59. LAMPE, E. W., MOBERG, A. W., SIMMONS, R. L., NAJARIAN, J. S. Impairment of glucose homeostasis after hepatic ischemia. J. Surg. Res., v. 11, n. 5, p. 224-231, 1971.
60. LEHNINGER, A. L., SUDDTH, H. C., WISE, J. B. D- β -hidroxybutirate dehydrogenase of mitochondria. J Biol Chem, v.235, p. 2450, 1960.
61. LEHNINGER, A. L. Glicólise: a via central do catabolismo da glicose. In: _____ Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1984. cap. 15, p. 288-310.
62. LINDBERG, B. Liver circulation and metabolism in hemorrhagic shock. Acta Chir. Scand., v. 476, p. 1-18, 1977.
63. MACKENZIE, R. J., FURNIVAL, L. M., WOOD, C. B., O'KEANE, M. A., BLUMGART, L. H. The effect of prolonged hepatic ischaemia before 70 per cent partial hepatectomy in the dog. Br. J. Surg., v. 64, p. 66-69, 1977.
64. MADISON, L. Physiologic significance of the secretion of endogenous insulin into the portal circulation. The quantitative importance of the liver in the disposition of

- glucose loads. Diabetes, v.12, p. 8, 1963.
65. MARUBAYASHI, S., TAKENAKA, M. et al. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemic and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. Transplantation, v. 30, p. 294-296, 1980
66. MARUBAYASHI, S., DOHI, K., KAWASKI, T. Role of free radicals in ischemia rat liver cell injury. Prevention of damages by vitamin E, coenzyme Q₁₀, or reduced glutathione administration. Surg. Forum, v. 36, p. 136-138, 1985.
67. MARUBAYASHI, S., DOHI, K., OCHI, K., KAWASAKI, T. Role of free radicals in ischemic rat liver injury: prevention of damage alfa - tocopherol administration. Surgery, v. 99, n. 2, p. 184-191, feb., 1986.
68. MATTHEWS, N., NEALE, M. L. Studies on the mode of actions of tumor necrosis factor on tumor cells in vitro. In: PICK, E. Lymphokines. New York. Academic, 1987, v. 14, p.223.
69. MAYS, E. T. Vascular occlusion. Surg. Clin. North Am., v. 57, p. 291-323, 1977.
70. MCMASTER, P., MEDD, R. Total hepatic ischaemia in the rhesus monkey. Br. J. Surg., v. 64, p. 819-821, 1977.
71. MELO, C. L. Estudo farmacológico da Ternatina um flavonóide isolado de Egletes viscosa, Less. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/Centro de ciências da saúde/Departamento de fisiologia e farmacologia, 1991. 118 p. (Dissertação

72. MORENO, A. H., ROUSSELOT, L. M., BURCHEL, A. R., BONO, R. F., BURKE, J. H. Studies on the outflow tracts of the liver. Ann. Surg., v. 155, n. 3, p. 412-426, 1962.
73. NEMLANDER, A., AHONEN, J., WIKTOROWICZ, K. et al. Effect of cyclosporin on wound healing. Transplantation, v. 36, p. 1-6, 1983.
74. NEWSHOLME, E. A., LEECH, A. R. Metabolism and acid/base balance. In: _____ Biochemistry for the medical sciences. John Wiley & sons, 1983, cap. 13, p. 528-529.
75. NEWSHOLME¹, E. A., START, C. Regulation of carbohydrate in liver. IN: _____ Regulation in metabolism. England. J. W. Arrowsmith Bristol, 1981, cap. 6, p. 247-291.
76. NEWSHOLME², E. A., START, C. Regulation of glycogen metabolism. In: _____ Regulation in metabolism. England. J. W. Arrowsmith Bristol, 1981, cap 4, p. 157.
77. NEWSHOLME³, E. A., START, C. Regulation of fat metabolism in liver. In: _____ Regulation in metabolism. England. J. W. Arrowsmith Bristol, 1981. cap. 7, p. 300-323.
78. NEWSHOLME⁴, E. A., START, C. The [NAD⁺]/[NADH] ratios in the cytoplasmic and mitochondrial compartments of the liver cell. In: _____ Regulation in metabolism. England. J. W. Arrowsmith Bristol, 1981, cap 7, p. 324-328.
79. NORDLINGER, B., DOUVIN, D., JAVAUDIN, L. et al. An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. Surg. Gynecol. Obstet., v. 150, p. 859-864, 1980.

80. NORDSTROM, G., SEEMAN, T., HASSENGREN, P. O. Beneficial effect allopurinol in liver ischemia. Surgery, v. 97, n. 6, p. 679-683, june, 1985.
81. NUNES, G., BLAISDELL, F. W., MARGARETTEN, W. Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma. Arch. surg, v. 100, p. 546-556, 1970.
82. OZAWA, K., FUJUMOTO, T., NAKATANI, T., ASANO, M., AOYAMA, H., TOBE, T. Changes in hepatic energy charge, blood ketone body ratio and indocyanine green clearance in relation to DNA synthesis after hepatectomy. Life Sci., v.31, p. 647,1982.
83. PACHTER, SPENCER, F., HOFSTTER, S., COPPA, G. Experience with finger fracture technique to achieve intrahepatic hemostasis in 75 patients with severe injuries of liver. Ann. Surg., v. 197, p. 771-778, 1983.
84. PARKS, D. A., BULKLEY, G. B., GRANGER, D. N. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. Surgery, v. 94, n. 3, p. 428-432, sept., 1983.
85. PARKS, D. A., GRANGER, D. N. Ischemia - reperfusion injury: a radical view. Hepatology, v. 8, n. 3, p. 680-682, 1988.
86. PEGG, D. E. Preservação de órgãos. Clínicas Cirúrgicas da América do Norte, v. 3, p. 635-650, 1986.
87. POLLACK, H., MILLET, R. F. Glucose tolerance of dehepatized animals. Mayo Clinic Proc., v.8, p. 557, 1933.
88. PRINGLE, J. H. Notes of the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. Ann. of Surg., v. 48, p. 541-549, 1908.

89. RAFFUCI, F. L. The effects of temporary occlusion of the afferent hepatic circulation in dogs. Surgery, v. 33, p. 342-351, 1953.
90. RAO, V. S. N., FIGUEIREDO, E. G., MELO, C. L., VIANA, G. S. B., MENEZES, D. B., MATOS, M. S. F., SILVEIRA, E. R. Protective effect of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less, in experimental liver injury. Pharmacology ("inpress").
91. ROYLE, G., KETTLEWELL, M. G. W. Liver function tests in surgical infection and malnutrition. Ann. Surg., v. 192, p. 192-194, 1980.
92. SCHWARTZ, S. I. Hepatic resection. Ann. Surg., v. 211, n. 1, p. 1-8, 1990.
93. SLEIN apud VASCONCELOS, P. R. L. Hepatic metabolism during sepsis. Oxford: University Oxford, 1987, p. 54. Tese (Doctor of philosophy).
94. SOUZA, M. F., RAO, V. S. N., SILVEIRA, E. R. Anti-anaphylactic and anti-inflammatory effects of ternatin, a flavonoid isolated from *Egletes viscosa* Less. Brazilian J Med Biol, v. 25, p. 1029-1032, 1992.
95. STARZL T. E., IWATSUKI, S., SHAW, B. W., GORDON, R. D. Orthotopic liver transplantation in 1984. Transplant. Proc., v. 17, p. 250-258, 1985.
96. SUC, B., PANIS, Y., BELGHITI, J., FEKETE, F. "Natural history" of hepatectomy. Br. J. Surg., v. 79, n. 1, p. 39-42, jan., 1992.

97. TAKI, Y., UKIKUSA, M., MORIMOTO, T. et al. Short-term changes in blood ketone body ratio in the phase immediately after liver transplantation. Transplantation, v. 43, n. 3, p. 350-353, march, 1987.
98. TANAKA, J., OZAWA, K., TOBE, T. Sinificance of blood ketone body ratio as an indicator of hepatic cellular energy status in jaundiced rabbits. Gastroenterology, v. 76, n. 4, p. 691-696, april, 1979.
99. TERBLANCHE, J., KRIGE, J. E. J., BORNMAN, P. C. Simplified hepatic resection with the use of prolonged vascular inflow occlusion. Arch. Surg., v. 126, p. 298-301, 1991.
100. T'HART, B. A., IP VAI CHING, T. R. A. M., VAN DIGK, H., LABADIE, R. P. How flavonoids inhibit the generation of lumiol-dependent chemiluminescence by activated human neutrophils. Chem. Biol. Interact., v. 73, p. 323-335, 1990.
101. TOWNSEND, M. C., HAMTON, W. W., HAYBRON, D. M. et al. Effective organ blood flow and bioenergy status in murine peritonites. Surgery, v. 100, p. 205-231, 1986.
102. VALENZUELA, A., LAGOS, C., SCHMIDT, K., VIDELA, L. A. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in rat. Biochem. Farmacol., v. 34, p. 2209-2212, 1985.
103. VASCONCELOS, P. R. L. Hepatic metabolism during sepsis. Oxford: University Oxford, 1987. 267 p. Tese (Doctor of phylosophy).

104. VIDELA, L. A., FERNANDEZ, V., VALENZUELA, A., UGARTE, G.
Effect of (+) cyanidonol-3 on the changes in liver glutathione content and lipoperoxidation induced by acute ethanol administration in the rat. Pharmacology, v.22, p. 343-348, 1981.
114. WALTUCK, T. L., CROW, R. W., HUMPHREY, J. F., KAUFFMAN, H. M.
Avulsion injuries of the vena cava following blunt abdominal trauma. Ann. Surg., v. 171, p. 67-72, 1970.
115. WATERHOUSE, C., KEILSON, J. Cori Cycle activity in man. J. Clin. Invest., v. 48, p. 2359-2366, 1969.
116. WEED, R. I., LA CELLE, P. L., MERRIL, E. W. Metabolic dependence of red cell deformability. J. Clin. Invest., v. 48, p. 795-809, 1969.
117. WILLIAMSON, D. H., MELLANBY, J., KREBS, H. A. Enzymic determinations of the D-(-) β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. Biochem. J., v. 82, p. 90-96, 1962.
118. WILLIAMSON, D. H., LUND, P., KREBS, H. A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem. J., v. 103, p. 514-527, 1967.
119. WOLLENBERGER apud NEWSHOLME, E. A., LEECH, A. R. Regulation of glucose and fatty acid oxidation in relation to energy demand in muscle. In: _____ . Biochemistry for the medical sciences. New York. John Wiley & sons, 1983, cap.

7, p. 332-333.

120. WUSTERMAN, M. C. The effect of warm ischaemia on the function of rabbit kidneys measured by isolated normothermic perfusion. J. Surg. Res., v. 23, p. 332-338, 1977.

121. YAMAMOTO, M., TANAKA, J., OZAWA, K., TOBE, T. Significance of acetoacetate/ β -hydroxybutyrate ratio in arterial blood as an indicator of the severity of hemorrhagic shock. J. Surg. Res., v.28, p. 124, 1980.