

# Vinicius Rocha Santos

Isquemia-reperfusão hepática em ratos: efeitos da  
administração endovenosa da solução salina  
hipertônica a 7,5% associada a pentoxifilina

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Programa de: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Telesforo Bacchella

São Paulo  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Vinicius Rocha

Isquemia-reperusão hepática em ratos : efeitos da administração endovenosa da solução salina hipertônica a 7,5% associada a pentoxifilina / Vinicius Rocha Santos. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Telesforo Bacchella.

Descritores: 1.Fígado 2.Isquemia 3.Reperusão 4.Pentoxifilina

USP/FM/DBD-292/10

## ***Dedicatória***

Dedico todo meu esforço empenhado neste trabalho:

A Deus por me capacitar, sem o qual nada disto teria valor.

Ao meu falecido avô Jorge, por me inspirar, homem idôneo e cirurgião exemplar, que tantas portas me abriram mesmo sem sua presença física.

Ao meu falecido pai Jorge, por acreditar quando ninguém acreditava.

À minha doce mãe, pelo incentivo constante, pelo exemplo que me deu de que trabalho com dedicação é sinônimo de sucesso.

À minha amada esposa Aline, querida filha Maria Fernanda e futuro filho Guilherme, minha família, que mesmo nos dias mais duros da minha profissão me fazem sorrir e acreditar que vale a pena continuar.

# **AGRADECIMENTOS**

**Ao amigo e orientador Prof. Dr. Telesforo Bacchella**, exemplo na medicina e na vida pessoal, pela paciência dispensada nestes anos todos de convívio e ensino.

**Ao Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado**, meu co-orientador, pela experiência, criatividade e conhecimento que o tornam uma pessoa ímpar.

**Ao Prof. Dr. Luis Augusto Carneiro D'Albuquerque**, pelo incentivo imediato e estímulo constante que permite que as pessoas ao seu redor cresçam.

**A Dra. Estela Regina Ramos Figueira**, pelo rigor acadêmico com que me auxiliou, pela profundidade e domínio deste tema.

**Às amigas, Ana Maria Mendonça Coelho, Sandra Nassa Sampietre e Nilza Aparecida Molan**, pela ajuda científica e técnica que jamais me foram negadas.

**Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto**, pela contribuição inquestionável que me forneceu para a análise estatística deste trabalho.

**À Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite**, que através de seu conhecimento nos forneceu as informações do diagnóstico anátomo-patológico em todos os casos estudados.

**Aos meus colegas médicos-assistentes do Serviço de Transplante e Cirurgia do Fígado** que não ousarei mencionar os nomes pelo risco que corro em deixar injustamente alguém de fora. Agradeço a todos imensamente, pois sem a cobertura dispensada na enfermaria, centro-cirúrgico e ambulatório esta tese em hipótese alguma seria concluída.

**Às enfermeiras, auxiliares e funcionários do transplante e cirurgia do fígado** pela convivência diária que nos dá ânimo para continuar nesta empreitada.

*"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo, glória, mesmo se expondo à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, que não conhecem vitória nem derrota."*

*(Theodore Roosevelt)*

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de siglas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	10
3 MÉTODOS	12
3.1 Aspectos éticos	13
3.2 Animais de experimentação	13
3.3 Indução da isquemia/reperfusão hepática	14
3.4 Desenho experimental	15
3.5 Administração das soluções	18
3.6 Coleta de material para análise	19
3.7 Análise do material coletado	20
3.7.1 Enzimas hepáticas	20
3.7.2 Mediadores inflamatórios	20
3.7.3 Extração do azul de Evans	21
3.7.4 Atividade da mieloperoxidase pulmonar	21
3.7.5 Respiração mitocondrial hepática	22
3.7.6 Peroxidação lipídica	23
3.7.7 Histologia	23
3.8 Análise estatística	25



4 RESULTADOS	26
4.1 Análise das transaminases	27
4.2 Análise das Interleucinas 6 e 10	31
4.3 Análise da extração do azul de Evans	33
4.4 Análise da mieloperoxidase pulmonar	35
4.5 Análise da respiração mitocondrial	37
4.6 Análise da dosagem de malondialdeído (TBARS)	45
4.7 Análise histológica	47
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	65
7 ANEXOS	66
8 REFERÊNCIAS	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

Dr.	doutor
Et al .	e outros
Prof.	professor

## LISTA DE SÍMBOLOS

/	por
°C	grau centígrado
DO	densidade ótica
DP	desvio padrão
g	grama
H <sup>+</sup>	hidrogênio
Hz	hertz
K <sup>+</sup>	potássio
Kg	kilograma
L	litro
mEq	miliequivalente
mg	miligrama
ml	mililitro
Na <sup>+</sup>	sódio
NaCl	cloreto de sódio
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	sódio/potássio
ng	nanograma
nm	nanômetro
O <sup>2</sup>	oxigênio
pg	picograma
U	unidade

## LISTA DE SIGLAS

ADP	adenosina difosfato
ADP/O	razão ADP por consumo de oxigênio
ALT	aspartato alaninotransferase
AMP	adenosina monofosfato
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
C5a	subtipo do complemento
CK	célula de Kupffer
CKa	célula de Kupffer ativada
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERO	espécies reativas de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo
HPTX	solução salina hipertônica 7,5% associada à pentoxifilina
ICAM	molécula de adesão
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
I/R	isquemia-reperfusão
LIM-37	laboratório de investigação médica 37 da FMUSP
MPO	mieloperoxidase
m-RNA	ácido ribonucleico mensageiro
RCR	razão do controle respiratório
S3	estado 3 da respiração mitocondrial
S4	estado 4 da respiração mitocondrial
SSF	solução salina fisiológica 0,9%
SSH	solução salina hipertônica 7,5%
GC	grupo controle
TNF $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
XO	xantina-oxidase

# RESUMO

Rocha-Santos V. *Isquemia-reperfusão hepática em ratos: efeitos da administração endovenosa da solução salina hipertônica associada a pentoxifilina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

**Introdução:** A isquemia-reperfusão hepática é um fenômeno inerente aos procedimentos cirúrgicos sobre o fígado. Descrita pela primeira vez em 1975, apresenta efeitos maléficos tanto locais quanto sistêmicos que aumentam a morbidade e mortalidade dos pacientes. Dentre as formas de se atenuar o processo, a utilização de drogas anti-inflamatórias como a solução salina hipertônica a 7,5% (SSH) e a pentoxifilina vêm sendo testadas com este propósito. As duas substâncias foram utilizadas conjuntamente (HPTX) em modelos experimentais em choque hemorrágico. Contudo, na isquemia-reperfusão de origem hepática, estas foram administradas apenas isoladamente, o que torna o presente estudo pioneiro nesta avaliação.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da solução salina hipertônica a 7,5% associada a pentoxifilina na isquemia-reperfusão hepática. **Métodos:** Foram utilizados 138 ratos Wistar divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento empregado: GC - grupo controle (sem tratamento), SSF - solução salina fisiológica, SSH - solução salina hipertônica a 7,5% e HPTX - solução salina hipertônica a 7,5% associada a pentoxifilina. A isquemia hepática foi realizada seletivamente sobre o pedículo comum do lobo mediano e ântero-lateral esquerdo pelo período de 60 minutos. As soluções foram administradas 15 minutos antes da reperfusão hepática. No sangue, foram analisadas as dosagens de transaminases hepáticas nos períodos de quatro e 12 horas e, interleucina-6 e interleucina-10 no período de 12 horas. No tecido pulmonar foram avaliadas as dosagens de azul de Evans e mieloperoxidase pulmonar nos períodos de quatro e 12 horas e, no tecido hepático do lobo isquêmico e não-isquêmico foram analisadas as dosagens de malondialdeído e a avaliação da respiração mitocondrial no período de quatro horas e a histologia nos períodos de quatro, 12 e 24 horas. **Resultados:** Os grupos tratados com SSH isolada ou em conjunto com a pentoxifilina apresentaram níveis significativamente menores ( $p < 0,05$ ) nas dosagens de transaminases e interleucina-6 em comparação aos outros dois grupos (GC e SSF). Resultados semelhantes entre os grupos foram observados no tecido pulmonar através da análise do azul de Evans e mieloperoxidase pulmonar em quatro e 12 horas e no tecido hepático com relação à respiração mitocondrial. No grupo no qual se adicionou pentoxifilina, houve diminuição estatisticamente significativa da peroxidação lipídica e da permeabilidade pulmonar tardia quando comparado ao grupo SSH. **Conclusões:** A utilização em conjunto das duas soluções reduziu: a resposta inflamatória sistêmica; as lesões histológicas e funcionais do fígado; o estresse oxidativo e a permeabilidade pulmonar.

Descritores: 1.Fígado 2.Isquemia 3.Reperfusão 4.Pentoxifilina

# **SUMMARY**

Rocha-Santos V. Liver ischemia-reperfusion in rats: The synergistic effects of hypertonic saline solution and pentoxifylline [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2010.

**Introduction:** The liver ischemia/reperfusion (I/R) injury caused by prolonged ischemia time triggers frequently a systemic inflammatory syndrome leading to remote organ damage. Previous studies have shown that resuscitation with hypertonic saline and pentoxifylline (HPTX) attenuates hemorrhagic shock-induced injury when compared with Ringer's lactate. However, it remains unclear if the HPTX protective effect occurs on liver I/R-induced injury, and if this effect overcomes the benefits of HTS used alone. **Objective:** Evaluated the effects of the combination of hypertonic saline solution (HTS) and pentoxifylline (PTX) on liver I/R injury in rats. **Method:** One hundred thirty eighth male Wistar rats underwent to one hour of partial liver ischemia performed by clamping the pedicle from the medium and left lateral lobes. Rats were divided into 4 groups: ischemia control group (C), normal saline (0.9% NaCl, 34ml/Kg) treated group (NS), hypertonic saline (7.5%NaCl, 0.4ml/Kg) treated group (HTS), and 7.5% NaCl (0.4ml/Kg) + PTX (25mg/Kg) treated group (HPTX). Samples were collected 4, 12 and 24 hours after reperfusion for determinations of serum AST, ALT, IL-6, and IL-10 levels, liver histology, liver mitochondrial oxidation and phosphorylation, and lipid peroxidation and pulmonary vascular permeability and myeloperoxidase (MPO). **Results:** The results showed a significant decrease in AST and ALT serum levels in HTS and HPTX groups compared to C and NS groups. Also a significant decrease in mitochondrial dysfunction was observed in HTS and HPTX groups compared to C and NS groups. The oxidative stress was significant decreased in HPTX group compared to C, NS and HTS groups in both ischemic and non-ischemic liver lobes. Elevation in serum IL-6 was significantly lower in HTS and HPTX groups compared to C and NS groups, but there was no difference in IL-10 levels. Pulmonary vascular permeability was significantly lower in groups HTS and HPTX compared with NS group, and even lower in HPTX group compared to HTS group ( $P < .05$ ). **Conclusion:** These data suggest that addition of pentoxifylline to hypertonic saline solution decreases the inflammatory response of the liver ischemia/reperfusion injury, decreasing the liver damage as well the pulmonary injury.

Descriptors: 1.Liver 2.Ischemia 3.Reperfusion 4.Pentoxifylline

# **1. INTRODUÇÃO**



A síndrome de isquemia-reperfusão (I/R) é um fenômeno frequente na prática clínico-cirúrgica que ocorre quando há interrupção temporária do fluxo sanguíneo para um órgão seguido de sua reperfusão. Pode ser ocasionada acidentalmente, como nos choques hemorrágicos, ou intencionalmente, neste caso, direcionada para um determinado órgão-alvo. Com relação ao fígado, o pinçamento do pedículo hepático, conhecido como manobra de Pringle, nas hepatectomias, e os períodos de isquemia quente e fria, no transplante hepático, são exemplos de situações onde ocorre o fenômeno de I/R<sup>1</sup>. O evento apresenta repercussões tanto locais como sistêmicas que podem comprometer negativamente a evolução clínica do paciente no pós-operatório<sup>2</sup>.

A importância dos efeitos da I/R hepática está no fato de, no intra-operatório, em muitas ocasiões, o fígado ser submetido a longos períodos de isquemia, como nas grandes ressecções por tumores, nas manobras para correção de hemostasia em politraumatizados e nas captações de enxertos hepáticos. A isquemia-reperfusão hepática como entidade foi descrita pela primeira vez por Toledo-Pereyra et al.<sup>3</sup> em 1975. Desde então, inúmeros autores avaliaram as consequências da I/R sobre o fígado, tanto na fase de isquemia, com interrupção abrupta do aporte de nutrientes e, principalmente de oxigênio, quanto no período de reperfusão, fase em que há intenso

## Introdução

---

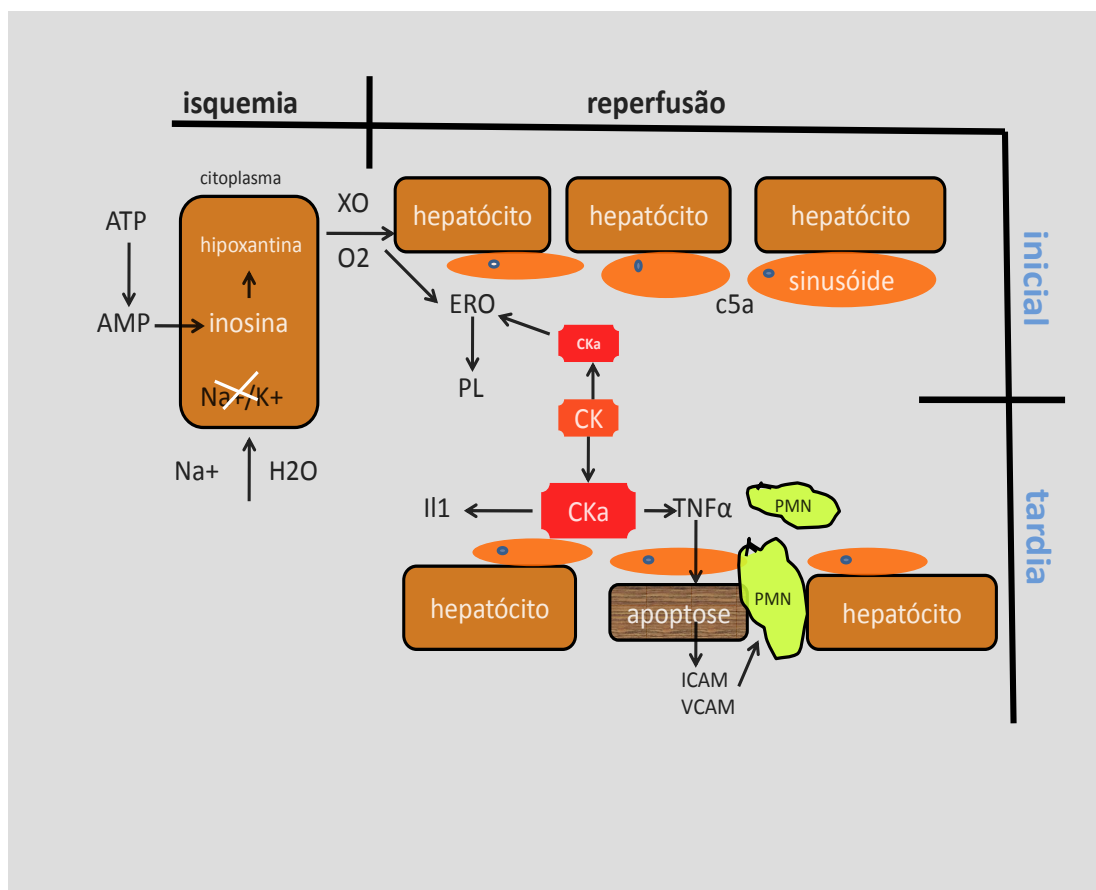
processo inflamatório associado à liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO)<sup>4,5</sup>.

A isquemia acomete a célula em todos os níveis, desde o núcleo, passando pelas mitocôndrias, membranas celulares e retículos endoplasmáticos. Durante a fase de isquemia, a adenosina trifosfato (ATP) é degradada à adenosina monofosfato (AMP), adenosina, inosina e, por fim, hipoxantina, sendo estas duas últimas acumuladas no citoplasma da célula após passar pela membrana mitocondrial. A redução dos níveis de ATP intracelular altera o funcionamento da bomba de sódio-potássio (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) aumentando, neste caso, o influxo de sódio (Na<sup>+</sup>) e, conseqüentemente de água para o interior do hepatócito, causando, por fim, edema celular<sup>6,7</sup>. O acúmulo de cálcio e alterações na homeostase de hidrogênio (H<sup>+</sup>) e de Na<sup>+</sup> ativam enzimas hidrolíticas que intensificam a lesão hepatocelular<sup>8-10</sup>.

Na etapa inicial da reperfusão, com a oferta de oxigênio, a xantina-oxidase (XO) oxida a hipoxantina acumulada pela degradação do ATP durante a fase de isquemia e, acaba liberando as ERO, que, por sua vez, lesam diretamente a célula através da participação ativa do complemento<sup>11,12</sup>. Na fase inicial da reperfusão inicia-se o processo de ativação das células de Kupffer<sup>5</sup>. A segunda fase da reperfusão, chamada de tardia, é caracterizada pela intensa ativação das células de Kupffer culminando com a liberação de moléculas pró-inflamatórias como as interleucinas e outras citocinas que acabam promovendo e amplificando a lesão hepatocelular<sup>13</sup>. A apoptose do hepatócito induz à maior atividade de moléculas de adesão intercelular e vascular (ICAM-1 e VCAM-1) além de

## Introdução

outras moléculas da família das selectinas<sup>14-17</sup>. A sequência de eventos mencionada acima provoca o seqüestro de neutrófilos para o interior dos sinusóides e, conseqüentemente, para o interior do parênquima hepático, contribuindo definitivamente para a lesão do hepatócito (Figura 1)<sup>18</sup>.



**Figura 1.** Esquema representativo e simplificado da lesão de (isquemia-reperfusão) hepática. Isquemia: acúmulo de hipoxantina no citoplasma do hepatócito. Bloqueio (X) da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (sódio-potássio) com acúmulo de Na<sup>+</sup> (sódio) e H<sub>2</sub>O (água). Reperfusão: fase inicial - xantina-oxidase (XO) oxida (O<sub>2</sub>) a hipoxantina, liberando ERO (espécies reativas de oxigênio) com participação ativa do complemento c5a (complemento) causando a PL (peroxidação lipídica). Fase tardia - Ativação de CKa (células de Kupffer ativada) com liberação de TNFα (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 (interleucina-1), causando apoptose do hepatócito, que ocasiona a migração de ICAM/VCAM (moléculas de adesão intercelular e vascular), e migração de PMN (polimorfonucleares).

Um outro importante mecanismo para explicar a causa da lesão tecidual na isquemia-reperfusão hepática é a ocorrência da peroxidação

## Introdução

---

lipídica (PL), causada, indiretamente, pela ação das ERO, e, portanto, sendo formada, principalmente, na primeira fase da reperfusão<sup>19-21</sup>. A PL não apenas inicia, mas propaga todo o processo de estresse oxidativo, mantendo relação direta entre tempo de isquemia e a intensidade da lesão de I/R hepática<sup>21</sup>.

Com efeito, a PL ocorre quando há remoção de H<sup>+</sup> das membranas fosfolípicas formando hidroperóxidos e radicais lipídicos e tem sido observada na I/R em diferentes órgãos<sup>22-24</sup>. Surpreendentemente, Fukai et al.<sup>25</sup> puderam observar a peroxidação lipídica logo na fase de isquemia, sugerindo a utilização de drogas antioxidantes já neste período.

Além dos efeitos locais sobre o parênquima hepático, a I/R produz uma síndrome inflamatória de repercussão sistêmica, sendo os pulmões, intensamente afetados, ocasionando aumento da permeabilidade vascular pulmonar, edema e nos casos mais graves, evoluindo para insuficiência respiratória<sup>26-28</sup>. Em animais de experimentação observa-se destruição dos septos interalveolares e aumento do influxo de neutrófilos para o interior do parênquima pulmonar quando há interrupção temporária do fluxo arterial para o fígado<sup>29</sup>. A lesão pulmonar resulta no fato de seu leito vascular ser o primeiro a receber o sangue proveniente do fígado pós-reperfusão, repleto de citocinas pró-inflamatórias e, recém submetido ao estresse oxidativo, com lesão direta das membranas alveolares<sup>30,31</sup>.

Na prática, toda a cascata inflamatória decorrente da lesão de I/R hepática contribui com maior ou menor intensidade para a disfunção dos enxertos nos transplantes hepáticos e com a insuficiência hepática pós-

## Introdução

---

operatória nas grandes hepatectomias, aumentando assim, a morbidade e a mortalidade destes pacientes<sup>2,29</sup>. No transplante de fígado, por exemplo, após 60 minutos de isquemia quente, observam-se sinais de lesão histológica definitiva e, a partir de 90 minutos, o fígado sofre alterações orgânicas e funcionais que aumentam a mortalidade do receptor<sup>6,32</sup>.

Devido à escassez de enxertos hepáticos provenientes de doadores falecidos em relação ao número de receptores em lista de espera, os critérios utilizados para aceitação destes órgãos vêm sendo progressivamente expandidos. Além disso, os limites impostos para as indicações de ressecções hepáticas têm sido constantemente aumentados, não apenas em relação ao volume a ser ressecado como ao número de procedimentos realizados, contribuindo, ainda mais para as lesões de I/R hepáticas graves. Estes dados reforçam a importância de se conhecer e procurar atenuar as lesões de I/R hepática.

Algumas medidas vêm sendo propostas com a finalidade de diminuir a intensidade da I/R hepática. Uma delas, o pré-condicionamento cirúrgico, consiste em realizar a interrupção temporária do fluxo sanguíneo hepático por um período de tempo mais curto, para, então, se realizar a isquemia definitiva. Clavien et al.<sup>33</sup> foram os primeiros autores a comprovarem sua eficácia na prática clínica. Uma outra alternativa para o tratamento da I/R, na qual está baseado o presente estudo, tem como alicerce a utilização de drogas endovenosas que bloqueiem e diminuam a produção e ação das citocinas inflamatórias e ERO, visando, desta maneira, a minimizar as consequências da I/R hepática. A pentoxifilina e a solução salina hipertônica

## Introdução

---

a 7,5% (SSH) são exemplos de substâncias que têm sido empregadas com esta finalidade<sup>34-37</sup>.

A utilização da SSH foi estudada, principalmente, no tratamento da lesão de I/R sistêmica em experimentos nos quais se induziam choque hipovolêmico ou sepse<sup>38,39</sup>. A SSH promove a expansão da volemia, além de melhorar o débito cardíaco, a microcirculação e a resposta imunológica no choque hipovolêmico provocado por trauma<sup>40</sup>. Além disso, a SSH diminui a ativação de macrófagos alveolares pulmonares através da redução do estresse oxidativo sistêmico em isquemia-reperfusão intestinal<sup>41</sup>.

Uma vez que o uso da SSH no tratamento do choque hemorrágico se mostrou eficiente, sua utilização foi ampliada em estudos experimentais para o tratamento da I/R de origem hepática, revelando, também neste caso, uma diminuição da intensidade do processo<sup>42</sup>. Nosso grupo, dentro da mesma linha de pesquisa do atual trabalho, já havia demonstrado os benefícios, tanto locais quanto sistêmicos, do emprego da SSH isolada, quando esta fora administrada quinze minutos antes da fase de reperfusão e analisada depois de quatro horas<sup>43</sup>.

Shield et al.<sup>44</sup> comprovaram que a SSH apresenta propriedade imunomodulatória reduzindo significativamente a resposta inflamatória através da diminuição dos níveis de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Adicionalmente, outros autores demonstraram relação direta do emprego da SSH e diminuição de moléculas de adesão intercelular e vascular no processo de I/R<sup>45</sup>.

## Introdução

---

A pentoxifilina (1-[5-oxohexil]-3,7-dimetilxantina) é um inibidor da fosfodiesterase que possui propriedade vasodilatadora, particularmente no fígado. Apesar de, inicialmente, ter sido utilizada para o tratamento de doenças vasculares periféricas por melhorar o fluxo microcirculatório, sabe-se que a pentoxifilina inibe os efeitos deletérios de algumas citocinas inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e interleucinas, minimizando assim a lesão hepatocelular<sup>46,47</sup>. A pentoxifilina atua comprovadamente nas hemácias, leucócitos e plaquetas resultando no aumento da sua deformidade e conseqüentemente diminuição da viscosidade sanguínea, possivelmente pelo aumento da concentração de ATP que leva à estabilização de membranas celulares<sup>48</sup>.

Existem evidências de que a transcrição de ácido ribonucléico mensageiro (m-RNA) para produção de citocinas nos monócitos seja bloqueada pela pentoxifilina<sup>49</sup>. O NF- $\kappa$ B é uma molécula de transcrição responsável por extrair do ácido desoxirribonucleico (DNA) a informação genética necessária para produção de mediadores inflamatórios. A transcrição do m-RNA, por sua vez, é dependente da ativação do NF- $\kappa$ B, desempenhando este, um papel central no controle da resposta imune e inflamatória<sup>49</sup>. A pentoxifilina bloqueia diretamente a produção de citocinas, através da inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, impedindo assim, que o processo de transcrição ocorra. Com efeito, a ação benéfica da pentoxifilina nas lesões de I/R hepática normotérmica foi demonstrada em estudo anterior, que comprovou a inibição da transcrição do m-RNA responsável pela produção de TNF $\alpha$ <sup>34</sup>.

## *Introdução*

---

Desde que a SSH e a pentoxifilina apresentem efeitos benéficos tanto na microcirculação como na redução do processo inflamatório, é possível que a associação destas duas substâncias em conjunto resulte na potencialização dos efeitos isolados de cada uma delas. Embora a associação das mesmas não tenha sido avaliada em relação a I/R hepática, a utilização simultânea destas duas drogas no tratamento do choque hemorrágico evidenciou redução da translocação bacteriana além da melhora do débito cardíaco e da oxigenação da mucosa gástrica<sup>50,51</sup>.

A associação de drogas para o tratamento de processos inflamatórios constitui-se no que há de mais moderno na terapêutica da lesão de isquemia-reperfusão, visando a englobar diferentes mecanismos e etapas do processo. A hipótese que norteia o presente trabalho é de que a associação da pentoxifilina a SSH estenda os efeitos benéficos já comprovados quando cada uma das drogas é utilizada isoladamente na I/R hepática, aumentando assim, o “armamentarium” terapêutico da lesão de I/R hepática.



## **2. OBJETIVO**

Avaliar os efeitos locais e sistêmicos da administração endovenosa da solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) associada a pentoxifilina na lesão de isquemia-reperfusão hepática em ratos.

## **3. MÉTODOS**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica (LIM/37) da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, HC-FMUSP), sob o número **0339/09**. As normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação foram respeitadas segundo o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996*.

### **3.2 Animais de experimentação**

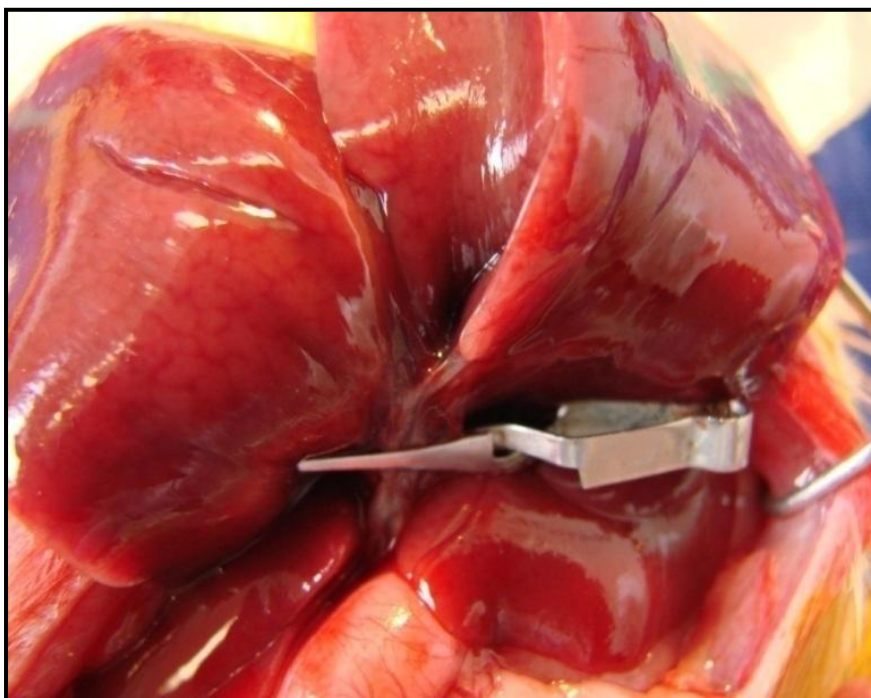
Foram utilizados 138 ratos Wistar, machos, com peso entre 230 e 270 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e mantidos no Laboratório de Investigação Médica - LIM 37, em ambiente com temperatura controlada (20-22°C) e com alimentação comercial (Nuvilab CR1-Nuvital Nutrientes LTDA) e água filtrada *ad libitum* em gaiolas individuais e, alternância dia e noite.

### **3.3 Indução da isquemia/reperfusão hepática**

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália), 30 mg/kg e cloridrato de xylazina 2% (Rompum®, Bayer), 30 mg/kg, submetidos à intubação orotraqueal com cateter nº16 (Jelco®) e, à ventilação mecânica (Harvard Rodent Ventilator model 683, USA), com frequência de 60 rpm e volume corrente de 0,08 ml por grama de peso.

Durante todo o procedimento, o animal foi aquecido com lâmpada halogênica de 45W e 127V. A temperatura corpórea, monitorizada por termômetro retal digital (YSI Precision 4000A Thermometer, USA), foi mantida entre 35 e 37°C.

A laparotomia foi realizada por incisão mediana estendendo-se por aproximadamente 4cm, a partir do apêndice xifóide. A isquemia hepática foi realizada seletivamente através do isolamento e oclusão do pedículo hepático comum dos lobos mediano e ântero-lateral esquerdo com pinça microvascular atraumática (Figura 2). Esta técnica permite a manutenção do fluxo portal para o interior do parênquima hepático evitando a estase venosa intestinal e possibilitando a avaliação dos lobos isquêmicos e não-isquêmicos.



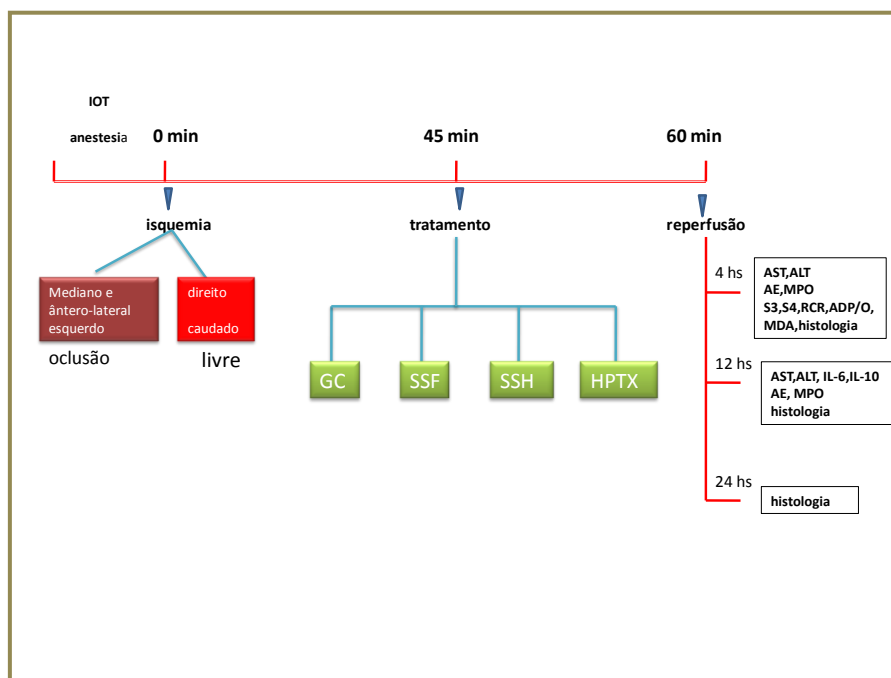
**Figura 2.** Isquemia hepática seletiva do lobo mediano e ântero-lateral esquerdo em rato.

O período total de isquemia foi de 60 minutos, sendo, então, efetuada a liberação da pinça vascular do pedículo hepático e, conseqüentemente a reperfusão dos lobos isquêmicos. A incisão foi novamente fechada com sutura contínua com *mononylon* 4.0. O animal, devolvido á gaiola individual, foi mantido aquecido após a recuperação anestésica.

### 3.4 Desenho experimental

Os 138 ratos do estudo foram distribuídos em quatro grupos de acordo com a solução administrada e o grupo sem tratamento. Dentro destes grupos, os animais foram subdivididos em conformidade com o período e o parâmetro a ser avaliado, em quatro, 12 ou 24 horas (Figura 3).

## Métodos



**Figura 3.** Representação esquemática do desenho experimental. IOT: intubação orotraqueal; min: minutos; GC: grupo controle/sem tratamento; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina; AST: aspartatoaminotransferase; ALT: alaninoaminotransferase; AE: azul de Evans; MPO: mieloperoxidase pulmonar; S3: estado3; S4: estado4; RCR: razão do controle respiratório; ADP/O: adenosina difosfato sobre consumo de oxigênio; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina-10.

**GC (grupo controle/sem tratamento)** - Vinte e sete ratos foram anestesiados e submetidos à anestesia e intubação orotraqueal. Após laparotomia foram submetidos à isquemia hepática parcial por 60 minutos sem administração endovenosa de drogas ou soluções. Estes animais foram sacrificados em quatro, 12 e 24 horas após a reperusão para a dosagem de transaminases e interleucinas (IL6 e IL10) séricas, azul de Evans e atividade de mieloperoxidase no pulmão e, no fígado dosagem de malondialdeído, estudo da respiração mitocondrial (S3, S4, RCR e ADP/O) e avaliação histológica.

**SSF (solução salina fisiológica a 0,9%)** - Trinta e sete ratos foram anestesiados e submetidos à anestesia e intubação orotraqueal. Após laparotomia foram submetidos à isquemia hepática parcial por 60 minutos. Foi administrada solução salina fisiológica a 0,9% na dose de 34ml/Kg, 45 minutos após a isquemia e 15 minutos antes da reperfusão. Estes animais foram sacrificados em quatro, 12 e 24 horas após a reperfusão para a dosagem de transaminases e interleucinas (IL6 e IL10) séricas, azul de Evans e atividade de mieloperoxidase no pulmão e, no fígado, dosagem de malondialdeído, estudo da respiração mitocondrial (S3, S4, RCR e ADP/O) e avaliação histológica.

**SSH (solução salina hipertônica a 7,5%)** - Trinta e sete ratos foram anestesiados e submetidos à anestesia e intubação orotraqueal. Após laparotomia foram submetidos à isquemia hepática parcial por 60 minutos. Foi administrada solução salina hipertônica a 7,5% isolada na dose de 4ml/Kg, 45 minutos após a isquemia e 15 minutos antes da reperfusão. Estes animais foram sacrificados em quatro, 12 e 24 horas após a reperfusão para a dosagem de transaminases e interleucinas (IL6 e IL10) séricas, azul de Evans e atividade de mieloperoxidase no pulmão e, no fígado, dosagem de malondialdeído, estudo da respiração mitocondrial (S3, S4, RCR e ADP/O) e avaliação histológica.

**HPTX (solução salina hipertônica a 7,5% associada a pentoxifilina)** Trinta e sete ratos foram anestesiados e submetidos à anestesia e intubação orotraqueal. Após laparotomia foram submetidos à isquemia hepática parcial por 60 minutos. Foi administrada solução salina



hipertônica a 7,5% na dose de 4ml/Kg associada a pentoxifilina na dose de 25mg/Kg, 45 minutos após a isquemia e 15 minutos antes da reperfusão. Estes animais foram sacrificados em quatro, 12 e 24 horas após a reperfusão para a dosagem de transaminases e interleucinas (IL6 e IL10) séricas, azul de Evans e atividade de mieloperoxidase no pulmão e, no fígado, dosagem de malondialdeído, estudo da respiração mitocondrial (S3, S4, RCR e ADP/O) e avaliação histológica.

O número de ratos por subgrupos de acordo com o período e material coletado encontra-se ilustrado nas Figuras 4 a 26 e descrito nos Anexos A-W.

### **3.5 Administração das soluções**

As soluções foram administradas por via endovenosa através de punção com agulha de insulina da veia peniana e injetadas pelo período de cinco minutos. Todas as drogas foram administradas 15 minutos antes da liberação da pinça vascular e reperfusão dos lobos isquêmicos, ou seja, 45 minutos após o início do período de isquemia.

A solução salina fisiológica a 0,9% foi administrada na dose de 34 ml/kg, de modo a fornecer quantidade equivalente de sódio (5 mEq/Kg) em comparação com a solução salina hipertônica; a solução salina hipertônica a 7,5% foi administrada na dose de 4 ml/Kg e, a pentoxifilina na dose de 25 mg/Kg. No grupo em que se associou a SSH com a pentoxifilina,

as drogas foram administradas em seringa única misturando-se a droga e a solução.

### **3.6 Coleta do material para análise**

Após a revascularização e recuperação da anestesia, foram retirados os catéteres da intubação orotraqueal e o animal acondicionado em gaiola individual com água *ad libitum*. Após cada período dos grupos acima mencionados, o rato foi novamente anestesiado com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar®, Cristália), 40 mg/kg e injetado, pela veia peniana, o corante azul de Evans (Sigma-Chemical Company, USA) na dose de 20mg/kg. Cada subgrupo foi submetido à reabertura da parede abdominal para coleta do material determinado para aquele período. O animal foi então sacrificado por secção da aorta e da veia cava inferior.

O fígado foi removido e nas amostras dos lobos isquêmicos e não-isquêmicos foram realizadas avaliações histológicas, da respiração mitocondrial e da peroxidação lipídica. A artéria pulmonar foi cateterizada via ventrículo direito com cateter de 2,0 mm de diâmetro (Silastic, Dow Corning, nº 602.175) para infusão de 30 a 50 ml de solução fisiológica, 10ml/min. O pulmão foi removido para a extração de azul de Evans e quantificação da mieloperoxidase tecidual para aquele determinado período.

No sangue, foi realizada a dosagem das transaminases hepáticas (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) e dos mediadores inflamatórios (IL-6 e IL-10). Como o corante azul de Evans interfere nas

dosagens dos mediadores inflamatórios, este grupo de animais foi utilizado somente para a avaliação do corante no pulmão.

### **3.7 Análise dos materiais coletados**

#### **3.7.1 Enzimas hepáticas**

As transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram analisadas como indicadores de lesão hepática após a reperfusão em quatro e 12 horas. As quantificações de AST e ALT foram realizadas pelo método ultravioleta (COBAS MIRA, Roche) otimizado de acordo com a *International Federation of Clinical Chemistry*. Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

#### **3.7.2 Mediadores inflamatórios**

Nas amostras de sangue coletadas foram dosados os seguintes mediadores inflamatórios: Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-10 (IL-10) no período de 12 horas após a reperfusão. Cada amostra coletada foi centrifugada por 10 minutos a 0°C e o sobrenadante estocado a -20°C. A quantificação dos mediadores inflamatórios foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) através da utilização dos kits da *Biosource International Cytoscreen* e, os resultados expressos em pg/ml.

### **3.7.3 Extração do azul de Evans**

Uma vez que o corante azul de Evans se liga principalmente à albumina, a permeabilidade vascular pulmonar foi avaliada pela quantificação do corante extraído. A dosagem avalia o aumento da atividade inflamatória e aumento da permeabilidade capilar com extravazamento de macromoléculas. Um fragmento do pulmão de cada animal foi utilizado para extração do azul de Evans no período de quatro e 12 horas após a reperfusão.

O corante foi extraído pela incubação dos fragmentos em tubos de ensaio com formamida (formamide, BDH Labs, England) na dose de 4 $\mu$ g/mg de tecido, por 24 horas, em temperatura ambiente. A quantidade de corante extraído do tecido foi determinada pelo espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm (ELX 808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc, USA). Os resultados expressos em microgramas de azul de Evans por grama de tecido seco.

### **3.7.4 Atividade da mieloperoxidase pulmonar**

A atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO) foi utilizada como indicador da presença de neutrófilos seqüestrados no pulmão e avaliada no período de quatro e 12 horas após a reperfusão. As amostras foram homogeneizadas com homogeneizador Polytron, usando tampão PBS contendo 0,5% de hexadecil e 5mM EDTA, pH 6,0. As amostras homogeneizadas foram submetidas ao ultrassom (40Hz) e, posteriormente,

centrifugadas a 3000g por minuto. A atividade da MPO no sobrenadante foi quantificada através da densidade óptica (DO) a 490nm resultante da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de O-dianisina. Os resultados foram expressos em DO a 490nm.

### **3.7.5 Respiração mitocondrial hepática**

A função mitocondrial hepática foi estudada nos lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos dos animais 4 horas após a reperusão e imediatamente após estes terem sido retirados e imersos em solução de homogeinização. O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi determinado polarograficamente, usando um oxígrafo 5/6 H (Gilson Medical Electronics, Inc) com eletrodo de O<sub>2</sub> (Clarck, Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, Ohio) a 28°C.

Para a determinação do estado 4 (S<sub>4</sub>) da respiração (estado basal), as mitocôndrias receberam succinato de potássio como substrato energético. O estado 3 (S<sub>3</sub>) da respiração (estado ativado) foi induzido pela adição de adenosina difosfato (ADP, Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri). Após todo o ADP ter sido fosforilado para ATP, S<sub>4</sub> foi medido novamente.

A razão do controle respiratório (RCR – relação entre a velocidade de consumo de oxigênio na presença de ADP (S<sub>3</sub>) e a velocidade obtida após o gasto final de ADP(S<sub>4</sub>) e a relação de ADP/consumo de oxigênio (ADP/O) foram calculadas como índices das funções oxidativas e

fosforilativas das mitocôndrias. Os estados S3 e S4 foram expressos em nanogramas (ng) de átomos de oxigênio por miligrama de proteína mitocondrial por minuto.

### **3.7.6 Peroxidação lipídica**

A quantificação da peroxidação lipídica no tecido hepático isquêmico e não-isquêmico foi realizada através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA) por meio de dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram homogeneizadas em KCL, centrifugadas e, no sobrenadante, foi adicionada uma solução contendo o ácido tiobarbitúrico, duodecilsulfato de sódio, ácido acético glacial e água destilada. A mistura foi aquecida a 90°C por 45 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (15.000rpm, 10 min). As concentrações dos produtos da peroxidação lipídica foram expressas pelo TBARS. Os resultados foram expressos em nmol/TBAR/mg proteína.

### **3.7.7 Histologia**

Os fragmentos do tecido hepático isquêmico e não isquêmico, fixados em solução de formol a 10% e corados com hematoxilina e eosina foram submetidos à análise histológica por microscopia óptica por um único patologista sem conhecimento dos grupos estudados. Foram analisados os seguintes parâmetros nos períodos de quatro, 12 e 24 horas pós-reperfusão:

## *Métodos*

---

1) tumefação hepatocelular, avaliada como alargamento e clareamento citoplasmático; 2) destrabeculação, definida como destruição do arcabouço hepatocitário; 3) esteatose hepática, revelando a presença de gotículas claras e bem delimitadas no hepatócito; 4) necrose hepática; 5) inflamação lobular com visualização de necrose focal permeadas por células inflamatórias; 6) inflamação portal, definida pelo aumento da população de células inflamatórias no espaço porta; 7) presença de células de Kupffer. As variáveis receberam um escore de zero a três, sendo zero a ausência de lesão, 1 a presença discreta e focal, 2 presença moderada e 3 a presença intensa de lesão visível à microscopia.

Para a pontuação global de cada amostra, foi utilizada a somatória dos pontos de cada variável, e, deste modo analisada a intensidade da lesão de isquemia-reperfusão. A necrose ganhou peso três e, as demais variáveis peso um (Quadro 1).

**Quadro 1. Gradação histológica da lesão de isquemia/reperfusão hepática.**

	Tumefação	Destrabeculação	Esteatose	Necrose	Inflamação lobular	Inflamação portal	Kupffer
<b>Ausente</b>	0	0	0	0 x 3	0	0	0
<b>Leve</b>	1	1	1	1 x 3	1	1	1
<b>Moderada</b>	2	2	2	2 x 3	2	2	2
<b>Grave</b>	3	3	3	3 x 3	3	3	3

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados anotados foram transferidos para um banco eletrônico do Microsoft Excel sendo submetidos à análise estatística pelo *Graph Pad Prism* versão 6.0, sendo o nível de significância adotado de 5% em todos os testes.

A análise descritiva do estudo foi preparada sob a forma de gráficos representada pelas Figuras 4-26 e os dados estão dispostos nos anexos A-W. Os resultados das dosagens das transaminases hepáticas (AST e ALT), do consumo de oxigênio pela mitocôndria, do corante azul de Evans, da atividade da mieloperoxidase pulmonar, dos mediadores inflamatórios (IL-6 e IL-10) e do malondiadeído, considerados variáveis paramétricas, foram analisados pelo teste “t” de Student. Os resultados não paramétricos da avaliação histológica dos tecidos hepáticos foram analisados pelo teste de Mann Whitney.



## **4. RESULTADOS**

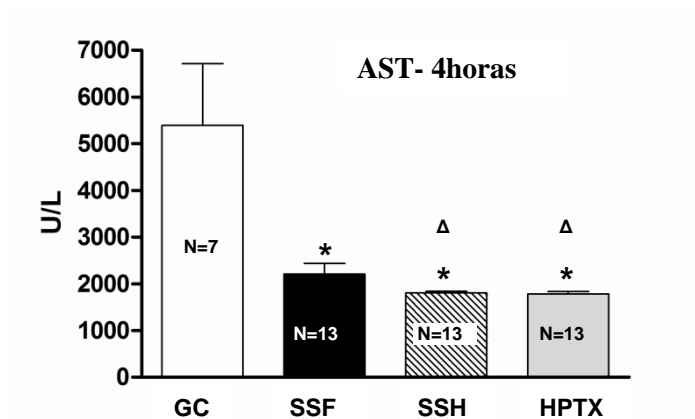
#### **4.1 Análise das dosagens de transaminases: AST e ALT**

##### **AST**

Os níveis séricos de AST foram significativamente maiores no GC do que nos demais grupos no período de 4 horas. Os animais que receberam SSH isolada ou em associação com pentoxifilina apresentaram níveis significativamente menores de AST quando comparados com animais que receberam SSF. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam SSH e SSH associada a pentoxifilina (Figura 4).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos níveis séricos de AST entre o GC e os demais estudados no período de 12 horas. Os animais que receberam SSH isolada ou em associação com pentoxifilina apresentaram níveis significativamente menores de AST quando comparados com animais que receberam SSF. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de AST entre os grupos que receberam SSH e os que receberam HPTX neste período (Figura 5).

## Resultados



**Figura 4.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens séricas de AST no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significante ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste "t" de Student.

GCxSSF: P=0,002

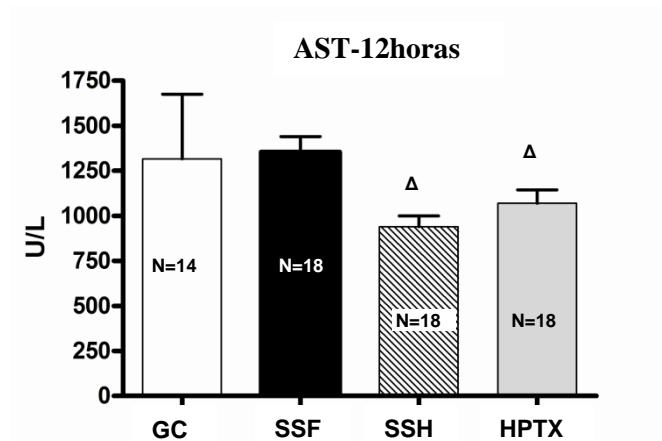
GC x SSH: P=0,0007

GC x HPTX: P=0,0007

SSF x SSH: P=0,047

SSF X HPTX: P=0,041

SSH X HPTX: P=0,36



**Figura 5.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens séricas de AST no período de 12 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significante ( $p < 0,005$ ):  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste "t" de Student

GC x SSF: P=0,45

GC x SSH: P=0,12

GC x HPTX: P=0,22

SSF x SSH: P=0,0002

SSF X HPTX: P=0,009

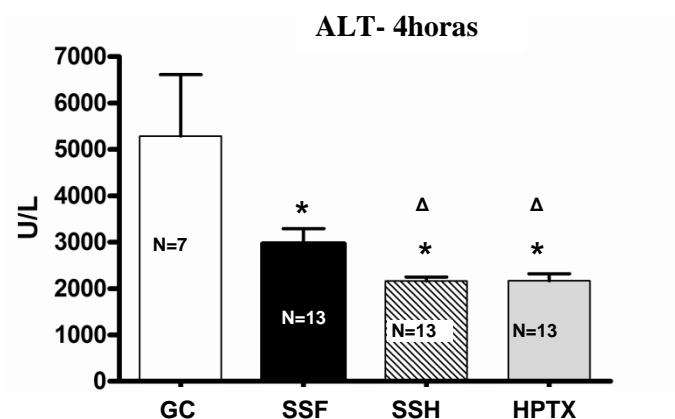
SSH X HPTX: P=0,093

**ALT**

Os níveis séricos de ALT foram significativamente maiores no GC do que nos demais grupos no período de 4 horas. Os animais que receberam SSH isolada ou em associação com pentoxifilina apresentaram níveis significativamente menores de ALT quando comparados com o grupo SSF. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos nos quais foram administradas SSH e HPTX (Figura 6).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os níveis séricos de ALT dos animais que não receberam tratamento e os demais grupos no período de 12 horas. Não houve diferença estatisticamente significante quando comparado o grupo que recebeu SSF e o os grupos com SSH com ou sem pentoxifilina. Também não houve diferença estatística quando comparado o grupo que recebeu SSH e o grupo no qual foi adicionado pentoxifilina a SSH (Figura 7).

## Resultados



**Figura 6.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens séricas de ALT no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste "t" de Student

GC x SSF:  $P=0,02$

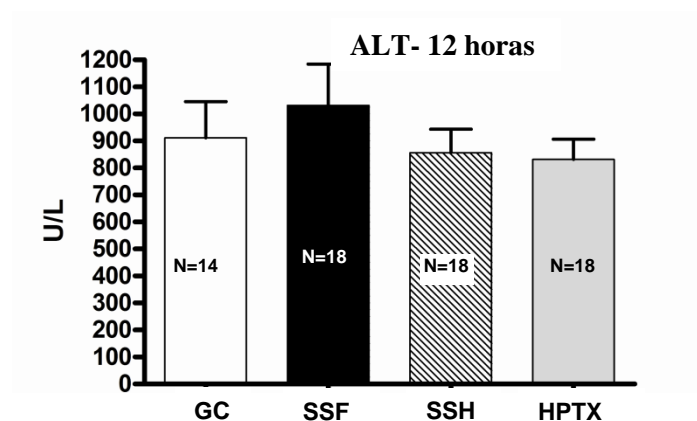
GC x SSH:  $P=0,002$

GC x HPTX:  $P=0,002$

SSF x SSH:  $P=0,013$

SSF X HPTX:  $P=0,019$

SSH X HPTX:  $P=0,48$



**Figura 7.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens séricas de ALT no período de 4 horas.

GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina.

Teste "t" de Student

GC x SSF:  $P=0,28$

GC x SSH:  $P=0,36$

GC x HPTX:  $P=0,29$

SSF x SSH:  $P=0,16$

SSF X HPTX:  $P=0,12$

SSH X HPTX:  $P=0,41$

## **4.2 Análise dos mediadores inflamatórios: IL-6 e IL-10**

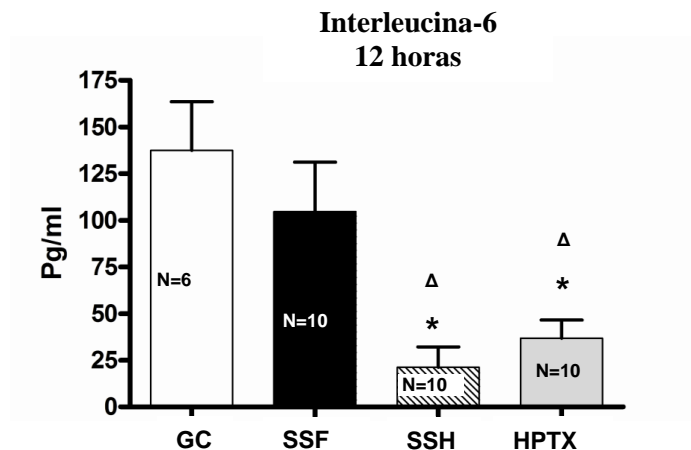
### **IL-6**

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de interleucina 6 no período de 12 horas entre o grupo controle e o grupo que recebeu SSF. Entretanto, quando se compara o grupo controle com os grupos nos quais foram administradas SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, os níveis de Interleucina-6 foram significativamente maiores no grupo sem tratamento. Os níveis de interleucina 6 também foram significativamente maiores nos ratos que receberam SSF se comparados às SSH e HPTX. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos SSH e HPTX (Figura 8).

### **IL-10**

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de interleucina-10 no período de 12 horas entre os grupos sem tratamento e os demais grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo que recebeu SSF e o os grupos que receberam SSH com ou sem pentoxifilina. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo que recebeu SSH e o grupo em que foi adicionado pentoxifilina (Figura 9).

## Resultados



**Figura 8.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens séricas de interleucina-6 no período de 12 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significante ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,21$

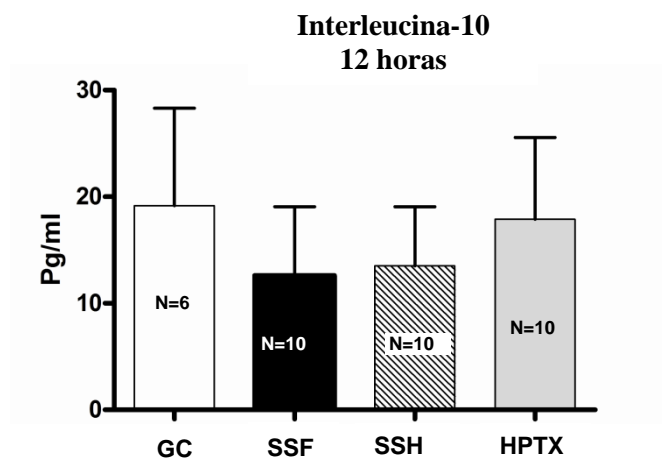
GC x SSH:  $P=0,0001$

GC x HPTX:  $P=0,0005$

SSF x SSH:  $P=0,004$

SSF X HPTX:  $P=0,017$

SSH x HPTX:  $P=0,1$



**Figura 9.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens séricas de interleucina-10 no período de 12 horas.

GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,27$

GC x SSH:  $P=0,29$

GC x HPTX:  $P=0,46$

SSF x SSH:  $P=0,45$

SSF X HPTX:  $P=0,30$

SSH X HPTX:  $P=0,32$

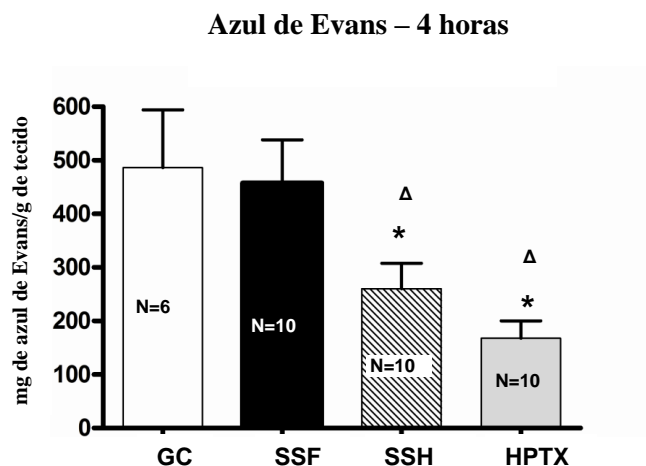
### **4.3 Análise da extração do azul de Evans pulmonar**

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis do azul de Evans extraído do tecido pulmonar dos animais do grupo controle e SSF no período de 4 horas. Entretanto, quando estes dois grupos são comparados aos grupos SSH e HPTX, estes últimos apresentaram resultados significativamente menores, expressando menor permeabilidade pulmonar. Apesar de não exibir resultados estatisticamente significantes, os pulmões dos ratos que receberam HPTX revelaram menor extração do corante quando comparados àqueles que receberam SSH (Figura 10).

Os níveis do azul de Evans no período de 12 horas foram significativamente menores no grupo HPTX quando comparados aos dos grupos controle, SSFe SSH. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que receberam SSH e SSF. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e SSF que exibiu níveis significativamente menores (Figura 11).



## Resultados



**Figura 10.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens dos níveis de azul de Evans no pulmão no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,41$

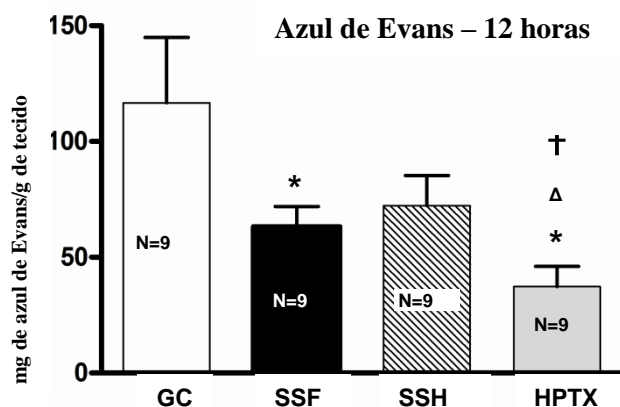
GC x SSH:  $P=0,022$

GC x HPTX:  $P=0,002$

SSF x SSH:  $P=0,024$

SSF X HPTX:  $P=0,002$

SSH X HPTX:  $P=0,06$



**Figura 11.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens dos níveis de azul de Evans no pulmão no período de 12 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF; † em relação à SSH.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,044$

GC x SSH:  $P=0,086$

GC x HPTX:  $P=0,008$

SSF x SSH:  $P=0,28$

SSF X HPTX:  $P=0,026$

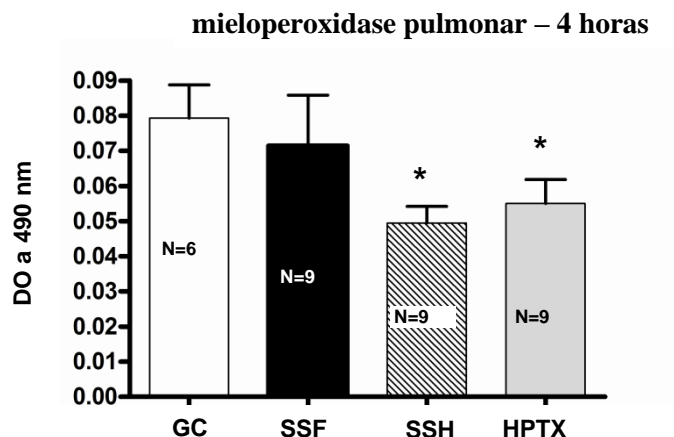
SSH X HPTX:  $P=0,019$

#### **4.4 Análise da atividade da mieloperoxidase pulmonar**

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de mieloperoxidase pulmonar no período de 4 horas entre os grupos GC e SSF. Entretanto, quando se compara o grupo controle com os grupos que foram administrados SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, os níveis de mieloperoxidase pulmonar foram significativamente maiores no GC. Não houve diferença estatística entre os demais grupos estudados (Figura 12).

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de mieloperoxidase pulmonar no período de 12 horas entre o grupo controle e o grupo SSF. Quando se compara o grupo controle com os grupos nos quais foram administradas SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, os níveis de mieloperoxidase pulmonar foram significativamente maiores no grupo sem tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo que recebeu SSH e o grupo em que foi adicionada a pentoxifilina, que por sua vez não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao SSF (Figura 13).

## Resultados



**Figura 12.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens dos níveis mieloperoxidase pulmonar no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC.

Teste “t” de Student

GC x SSF: P=0,34

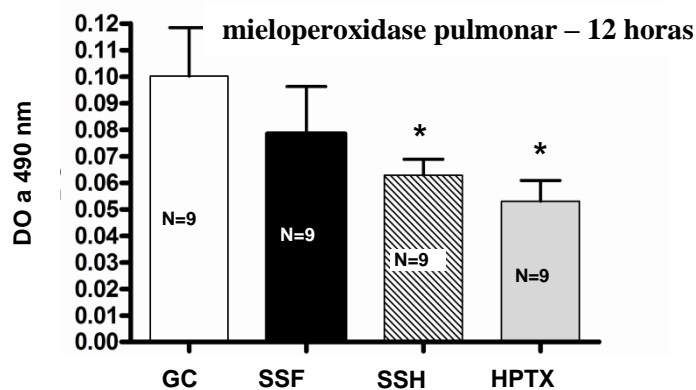
GC x SSH: P=0,008

GC x HPTX: P=0,026

SSF x SSH: P=0,083

SSF X HPTX: P=0,16

SSH X HPTX: P=0,26



**Figura 13.** Valores médios  $\pm$  DP das dosagens dos níveis mieloperoxidase pulmonar no período de 12 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC.

Teste “t” de Student

GC x SSF: P=0,2

GC x SSH: P=0,036

GC x HPTX: P=0,015

SSF x SSH: P=0,2

SSF X HPTX: P=0,1

SSH X HPTX: P=0,16

#### **4.5 Análise da respiração mitocondrial hepática**

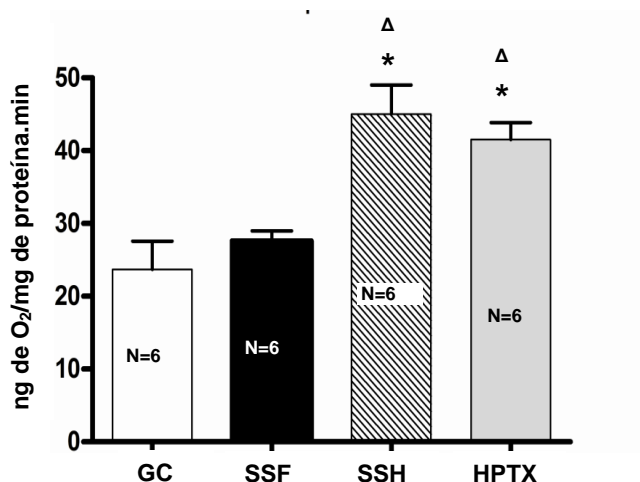
Foram avaliados os estados 3 (S3) e 4 (S4), além da razão do controle respiratório (RCR) e ADP/consumo de oxigênio (ADP/O) nos lobos hepáticos isquêmicos e não-isquêmicos no período de 4 horas após a reperfusão.

##### **S3**

Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação do estado S3 da respiração mitocondrial no período de 4 horas entre os grupos controle e SSF. Quando comparados com os grupos nos quais foram administradas SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, o grupo sem tratamento e o grupo com SSF demonstraram resultados significativamente menores expressando piora da função mitocondrial. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados o grupo que recebeu SSH e o grupo HPTX (Figura 14).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos resultados da avaliação do estado 3 da respiração mitocondrial no lobo não-isquêmico no período de 4 horas entre os grupos estudados (Figura 15).

## Respiração mitocondrial S3 – isquêmico 4 horas



**Figura 14.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação do estado 3 da respiração mitocondrial do lobo isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,27$

GC x SSH:  $P=0,014$

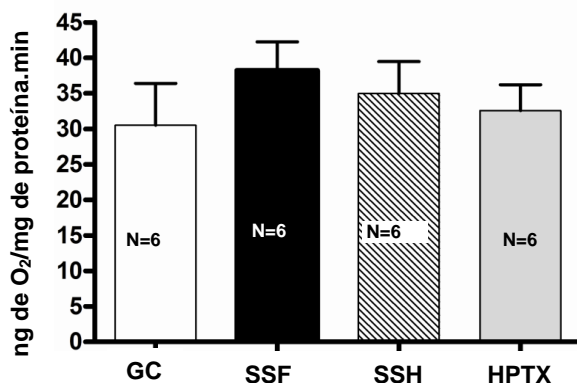
GC x HPTX:  $P=0,02$

SSF x SSH:  $P=0,01$

SSF X HPTX:  $P=0,003$

SSH X HPTX:  $P=0,31$

## Respiração mitocondrial S3 não-isquêmico 4 horas



**Figura 15.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação do estado 3 da respiração mitocondrial do lobo não-isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,15$

GC x SSH:  $P=0,28$

GC x HPTX:  $P=0,38$

SSF x SSH:  $P=0,30$

SSF X HPTX:  $P=0,16$

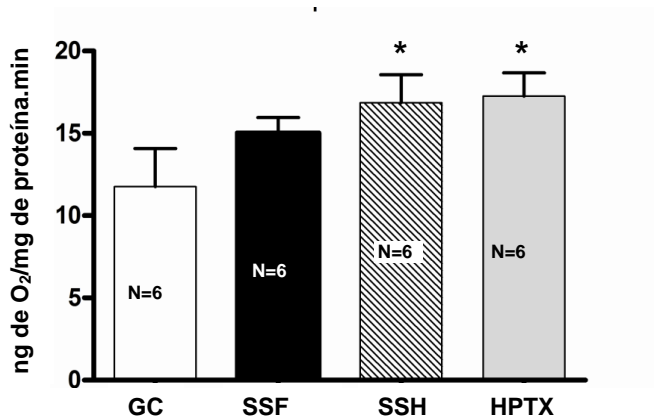
SSH X HPTX:  $P=0,34$

**S4**

Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação do S4 da respiração mitocondrial no lobo isquêmico no período de 4 horas entre os grupos controle e SSF. Quando comparados com o grupo controle, os grupos nos quais foram administradas SSH isolada ou em associação com pentoxifilina apresentaram resultados significativamente maiores. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupo que receberam SSH, HPTX ou SSF (Figura 16).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos resultados da respiração mitocondrial no estado S4 no lobo não-isquêmico no período de 4 horas entre os grupos estudados (Figura 17).

## Respiração mitocondrial S4 isquêmico 4 horas



**Figura 16.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação do estado 4 da respiração mitocondrial do lobo isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC

Teste "t" de Student

GC x SSF: P=0,10

GC x SSH: P=0,05

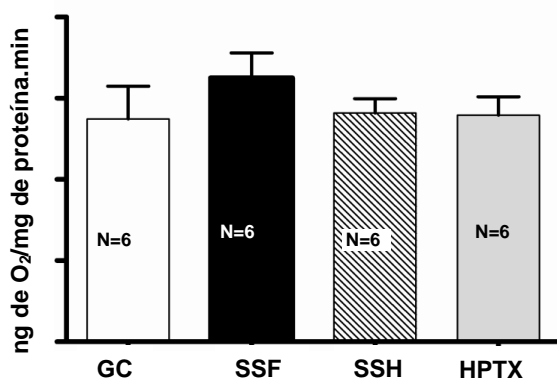
GC x HPTX: P=0,03

SSF x SSH: P=0,18

SSF X HPTX: P=0,10

SSH X HPTX: P=0,42

## Respiração mitocondrial S4 não-isquêmico 4 horas



**Figura 17.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação do estado 4 da respiração mitocondrial do lobo não-isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina .

Teste "t" de Student

GC x SSF: P=0,17

GC x SSH: P=0,43

GC x HPTX: P=0,46

SSF x SSH: P=0,12

SSF X HPTX: P=0,12

SSH X HPTX: P=0,46

**RCR**

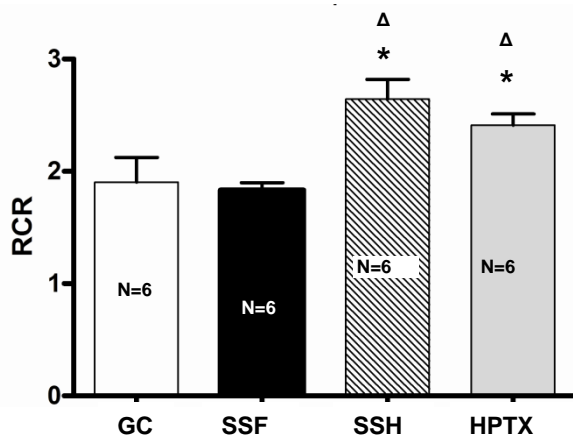
Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação da razão do controle respiratório da respiração mitocondrial no período de 4 horas entre os grupos controle e SSF. Quando comparados os grupos nos quais foram administradas solução SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, estes expressaram resultados significativamente maiores quando comparados aos grupos controle e SSF. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo que recebeu SSH com o grupo no qual foi adicionada pentoxifilina (Figura 18).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos resultados da razão do controle respiratório da respiração mitocondrial do lobo não-isquêmico no período de 4 horas entre os grupos estudados (Figura 19).



## Resultados

### Respiração mitocondrial RCR isquêmico 4 horas



**Figura 18.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação da razão do controle respiratório da respiração mitocondrial do lobo isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC; Δ em relação à SSF.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,38$

GC x SSH:  $P=0,013$

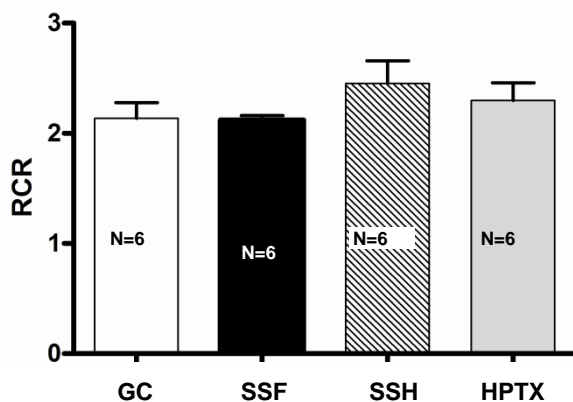
GC x HPTX:  $P=0,031$

SSF x SSH:  $P=0,0008$

SSF X HPTX:  $P=0,0003$

SSH X HPTX:  $P=0,14$

### Respiração mitocondrial RCR não-isquêmico 4 horas



**Figura 19.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação da razão do controle respiratório da respiração mitocondrial do lobo não- isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina .

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,45$

GC x SSH:  $P=0,11$

GC x HPTX:  $P=0,23$

SSF x SSH:  $P=0,069$

SSF X HPTX:  $P=0,15$

SSH X HPTX:  $P=0,28$

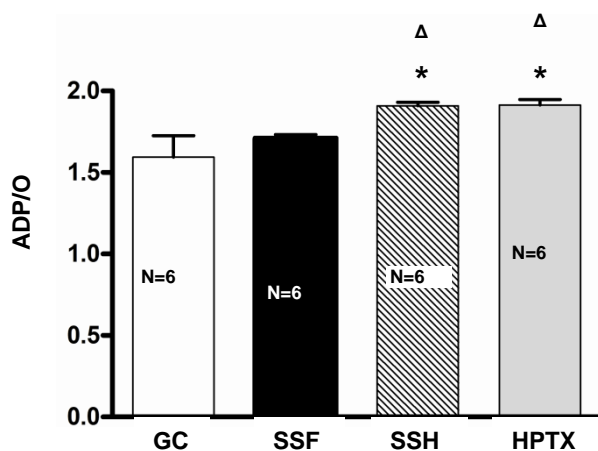
**ADP/O**

Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação da relação ADP/O no período de 4 horas entre os grupos controle e SSF. Quando comparados os grupos nos quais foram administradas SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, estes expressaram resultados significativamente maiores quando comparados aos grupos controle e SSF. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos que receberam SSH associada ou não a pentoxifilina (Figura 20).

Com relação aos lobos não-isquêmicos, não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação da ADP/O da respiração mitocondrial no período de 4 horas entre os grupos controle e SSF. Quando comparados os grupos nos quais foram administradas SSH isolada ou em associação com pentoxifilina, estes apresentaram resultados significativamente maiores quando comparados aos grupos controle e SSF. Não houve diferença estatística quando comparado o grupo SSH e o grupo HPTX (Figura 21).

## Resultados

### Respiração mitocondrial ADP/O isquêmico 4 horas



**Figura 20.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação da ADP/O da respiração mitocondrial do lobo isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,19$

GC x SSH:  $P=0,019$

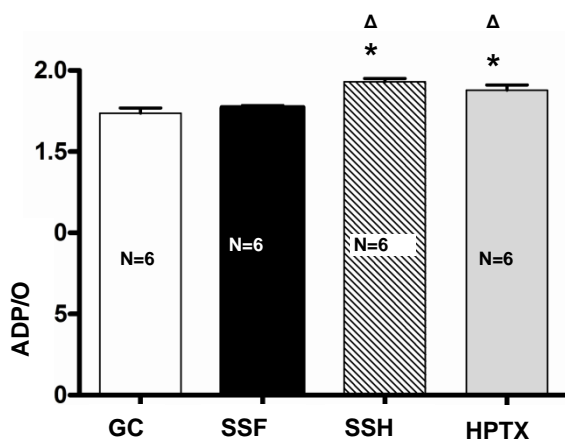
GC x HPTX:  $P=0,019$

SSF x SSH:  $P < 0,0001$

SSF x HPTX:  $P=0,0002$

SSH x HPTX:  $P=0,45$

### Respiração mitocondrial ADP/O não-isquêmico 4 horas



**Figura 21.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação da ADP/O da respiração mitocondrial do lobo não-isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste “t” de Student

GCxSSF:  $P=0,15$

GC x SSH:  $P=0,0002$

GC x HPTX:  $P=0,005$

SSF x SSH:  $P < 0,0001$

SSF x HPTX:  $P=0,004$

SSH x HPTX:  $P=0,10$

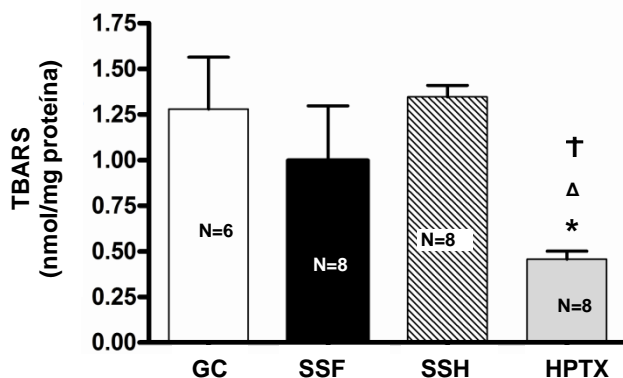
#### **4.6 Análise da dosagem tecidual de malondialdeído (TBARS)**

Houve diferença estatisticamente significativa na avaliação da dosagem tecidual do TBARS no lobo isquêmico no período de 4 horas entre o grupo HPTX, que apresentou níveis menores e os demais grupos. Quando os outros grupos foram comparados entre si, não se observou diferenças estatisticamente significantes (Figura 22).

Com relação ao lobo não-isquêmico, o grupo controle apresentou níveis significativamente maiores que os demais grupos. O grupo em que se associou a pentoxifilina apresentou níveis significativamente menores que os outros grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais que receberam SSF e SSH (Figura 23).

## Resultados

### Dosagem de TBARS isquêmico 4 horas



**Figura 22.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação da dosagem de TBARS do lobo isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF;  $\dagger$  em relação à SSH.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,26$

GC x SSH:  $P=0,39$

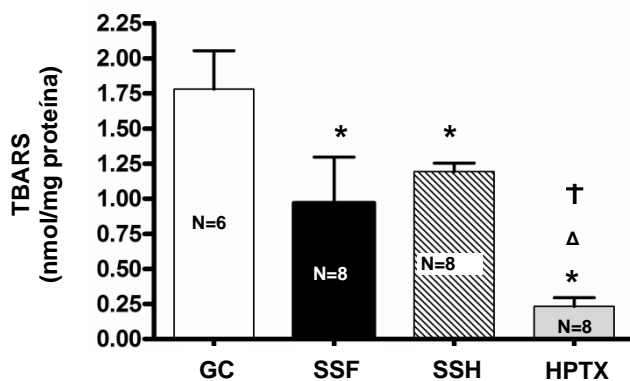
GC x HPTX:  $P=0,003$

SSF x SSH:  $P=0,13$

SSF X HPTX:  $P=0,049$

SSH X HPTX:  $P < 0,0001$

### Dosagem de TBARS não-isquêmico 4 horas



**Figura 23.** Valores médios  $\pm$  DP da avaliação da dosagem de TBARS do lobo não- isquêmico no período de 4 horas. GC: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF;  $\dagger$  em relação à SSH.

Teste “t” de Student

GC x SSF:  $P=0,047$

GC x SSH:  $P=0,016$

GC x HPTX:  $P < 0,0001$

SSF x SSH:  $P=0,25$

SSF X HPTX:  $P=0,022$

SSH X HPTX:  $P < 0,0001$

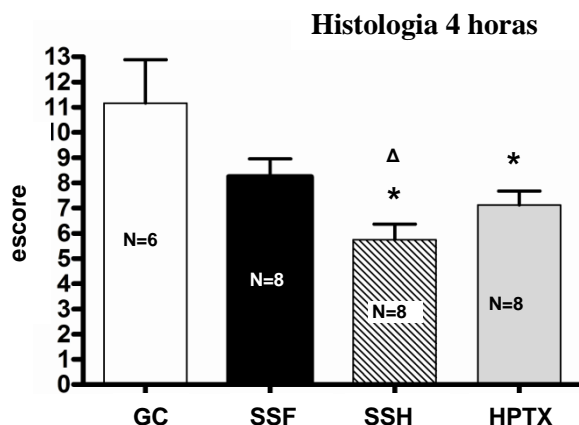
#### **4.7 Histologia**

No período de quatro horas, o grupo controle apresentou escore significativamente maior que os grupos que receberam tratamento com SSH e HPTX. O grupo que recebeu SSH isolada apresentou escore significativamente menor que o grupo que recebeu SSF. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam SSH associadas ou não à pentoxifilina (Figura 24).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados no período de 12 e 24 horas após a reperfusão (Figuras 25 e 26).

Não se observaram diferenças estatisticamente significantes nos períodos estudados dos lobos não-isquêmicos (escore 0).

## Resultados



**Figura 24.** Valores médios  $\pm$  DP do escore da avaliação histológica do lobo isquêmico no período de 4 horas. CG: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina. Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ): \* em relação ao GC;  $\Delta$  em relação à SSF.

Teste de Mann Whitney

GC x SSF:  $P=0,053$

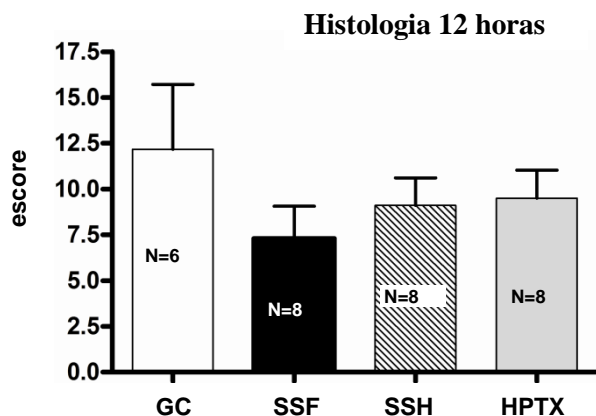
GC x SSH:  $P=0,004$

GC x HPTX:  $P=0,02$

SSF x SSH:  $P=0,01$

SSF X HPTX:  $P=0,11$

SSH X HPTX:  $P=0,08$



**Figura 25.** Valores médios  $\pm$  DP do escore da avaliação histológica do lobo isquêmico no período de 12 horas. CG: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina.

Teste de Mann Whitney

GC x SSF:  $P=0,28$

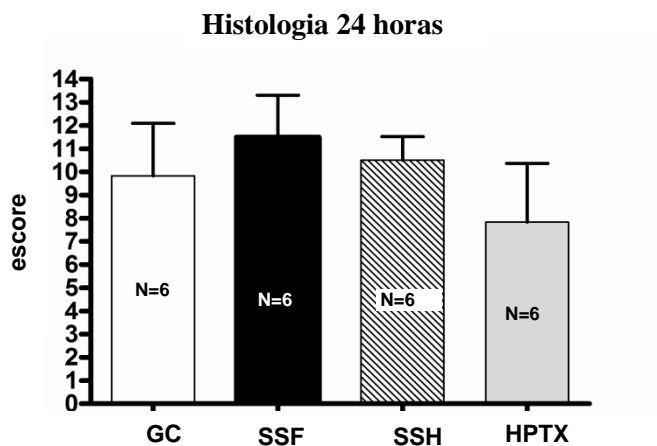
GC x SSH:  $P=0,33$

GC x HPTX:  $P=0,24$

SSF x SSH:  $P=0,32$

SSF X HPTX:  $P=0,36$

SSH X HPTX:  $P=0,16$



**Figura 26.** Valores médios  $\pm$  DP do escore da avaliação histológica do lobo isquêmico no período de 24 horas. CG: grupo controle; SSF: solução salina fisiológica; SSH: solução salina hipertônica; HPTX: solução salina hipertônica e pentoxifilina.

Teste de Mann Whitney

GC x SSF:  $P=0,28$

GC x SSH:  $P=0,39$

GC x HPTX:  $P=0,28$

SSF x SSH:  $P=0,32$

SSF X HPTX:  $P=0,13$

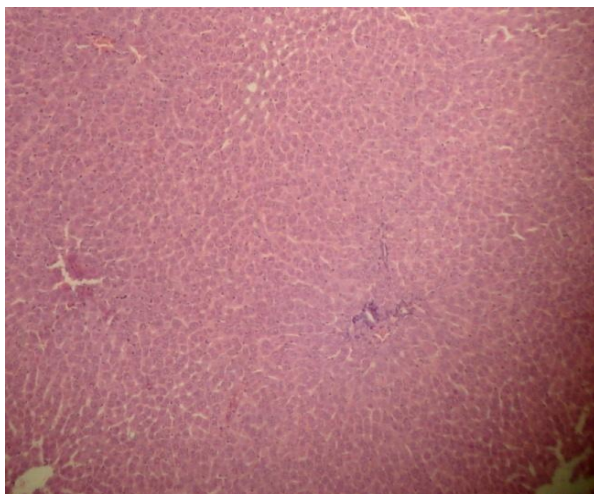
SSH X HPTX:  $P=0,17$

Os grupos SSH e HPTX apresentaram menor evidência de lesão histológica quando comparados ao grupo controle no período de 4 horas (Figuras 27 e 28).

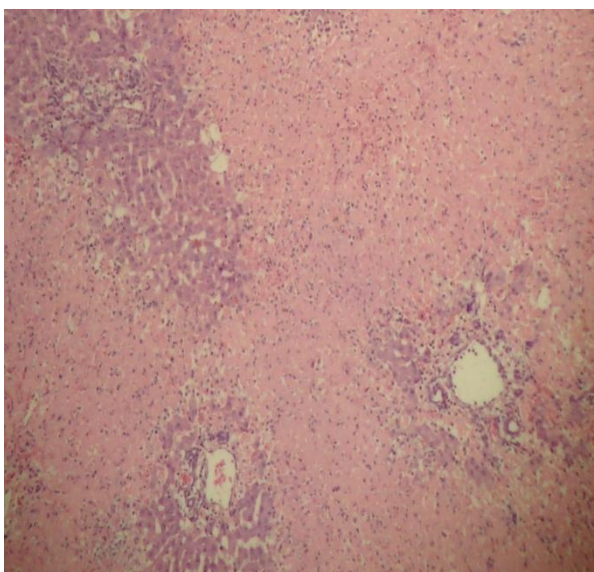


## Resultados

---



**Figura 27.** Micrografia de fígado normal em rato submetido à isquemia-reperfusão hepática e tratado com solução salina hipertônica associada a pentoxifilina no período de 4 horas após a reperfusão (H&E 40X).



**Figura 28.** Micrografia de fígado de rato submetido à isquemia-reperfusão hepática sem tratamento no período de 4 horas após a reperfusão (H&E 40X).

## **5. DISCUSSÃO**

---

A isquemia hepática temporária, realizada de forma planejada nas hepatectomias, tem a finalidade de delimitar a área de ressecção do fígado e auxiliar no controle hemorrágico durante o ato operatório. No transplante de fígado, a isquemia fria, durante o período de preservação, e a isquemia quente, na fase do implante, constituem etapas obrigatórias e indispensáveis. Entretanto, após a reperfusão do órgão, inicia-se o fenômeno conhecido como isquemia-reperfusão hepática, que implica em alterações tanto locais, sobre o parênquima hepático, como sistêmicas que, de acordo com sua intensidade, podem comprometer a evolução clínica do paciente no pós-operatório<sup>52,53</sup>. Apesar da síndrome ter sido descrita pela primeira vez há 35 anos, a fisiopatologia da I/R hepática ainda é um tema amplamente estudado, sobretudo, com relação aos mecanismos pelos quais podemos atenuar o processo<sup>3,12-14</sup>.

A escolha do modelo experimental, no presente estudo, para reproduzir a lesão de I/R hepática baseou-se em dois princípios: tempo de isquemia não superior a 60 minutos e preservação de segmento hepático livre de isquemia. Na fase inicial de implantação do nosso estudo piloto, houve a tentativa de se realizar a isquemia por período de 90 minutos, descartando-se este modelo devido à alta taxa de mortalidade dos animais. Em ratos Wistar, foi demonstrado que a realização de isquemia hepática por período que não ultrapasse uma hora provoca lesão hepática intensa e lesão pulmonar, todavia sem causar dano irreversível ao animal<sup>54</sup>. Em humanos, observa-se que isquemia hepática por período não superior a 60 minutos é

---

bem tolerada em pacientes com função hepática preservada<sup>55</sup>. Em contrapartida, no transplante de fígado notam-se lesões histológicas definitivas quando o tempo de isquemia quente aproxima-se deste período, uma vez que o enxerto já fora submetido previamente à isquemia fria<sup>56</sup>.

As segmentações hepáticas, múltiplas e lobuladas do rato, tornaram possível a abordagem dos pedículos com pouca manipulação cirúrgica do animal. A isquemia parcial, além de permitir a avaliação tanto do lobo hepático isquêmico como do não-isquêmico, preserva a drenagem mesentérica, minimizando assim, a interferência da estase venosa intestinal na avaliação do estudo. A técnica de pinçamento dos pedículos segmentares medianos e ântero-laterais esquerdos utilizada no presente estudo mantêm o fluxo hepático para aproximadamente 30% do volume do fígado do rato (Figura 2).

Nosso grupo já havia demonstrado, dentro desta mesma linha de pesquisa, os efeitos benéficos da SSH na I/R hepática no período de 4 horas após a reperfusão. Comprovamos que houve redução dos níveis de transaminases hepática, além da diminuição da permeabilidade pulmonar<sup>43</sup>. O atual trabalho ampliou esta avaliação para o período de 12 e 24 horas após a reperfusão, além de analisar os resultados com a associação de mais uma droga, a pentoxifilina. Desde que os efeitos da pentoxifilina e SSH apresentem algumas similaridades relacionadas às propriedades antiinflamatórias, a associação das mesmas poderia superar os efeitos benéficos de cada uma delas, especulando-se que possam atuar por diferentes mecanismos de ação e fases da Isquemia-reperfusão. O objetivo

---

de se associar as duas soluções está fundamentado na possibilidade de aproveitar estas propriedades administrando um volume total menor.

O papel antiinflamatório da SSH foi estudado no tratamento do choque hipovolêmico, evento que culmina em lesão de I/R sistêmica<sup>38,39</sup>. Além da reposição hídrica, a SSH aumentou o débito cardíaco e a resposta imunológica em trabalhos experimentais<sup>40</sup>. A eficácia da SSH no tratamento do choque hemorrágico expandiu sua utilização, em estudos experimentais, para a avaliação dos efeitos desta solução na I/R hepática. Oreopoulos et al.<sup>42</sup> foram os primeiros a verificar os benefícios da SSH quando administrada antes do início da fase de isquemia. Como relatado anteriormente, nosso laboratório foi pioneiro em demonstrar as vantagens da administração da SSH 15 minutos antes da fase de reperfusão<sup>43</sup>. É possível que, nestas circunstâncias, o pico de concentração de sódio e, particularmente os efeitos máximos da SSH coincidam com a liberação da pinça hemostática e conseqüentemente com a reperfusão dos segmentos isquêmicos.

Assim como a SSH, a pentoxifilina, foi estudada na I/R sistêmica demonstrando-se que, além dos efeitos hemorreológicos, a droga reduz as lesões teciduais através da diminuição da produção de citocinas inflamatórias<sup>48,49</sup>. No fígado, a pentoxifilina é capaz de suprimir a ativação de células de Kupffer e aumentar a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e, portanto, reduzir a intensidade da lesão hepática após a isquemia/reperfusão<sup>47,57-58</sup>.

---

El-Ghoneimi et al.<sup>34</sup> demonstraram a inibição da transcrição gênica do TNF $\alpha$  em ratos administrando pentoxifilina na dose de 50 mg/Kg em dois períodos: trinta minutos antes do início da isquemia e 30 minutos antes do período da reperfusão. O mesmo autor verificou a redução da desidrogenase láctica e dos níveis de transaminases melhorando, assim a sobrevivência dos animais<sup>34</sup>. O efeito citoprotetor da pentoxifilina na lesão de I/R hepática poderia estar relacionado, como mencionado acima, ao aumento na produção de prostaglandinas (PGE2)<sup>57</sup>. Outro estudo relacionou a atenuação da intensidade da lesão de I/R de enxertos hepáticos com o aumento da sobrevivência dos órgãos preservados em hipotermia por longos períodos após a administração de pentoxifilina<sup>47</sup>.

Em que pesem os efeitos da pentoxifilina e SSH apresentarem algumas similaridades relacionadas às propriedades antiinflamatórias, a associação das mesmas jamais fora testada na I/R hepática. Coimbra et al.<sup>59</sup> demonstraram uma diminuição da produção de ERO *in vitro* com a utilização da SSH associada à pentoxifilina em comparação com a SSH isolada. Outros dois estudos realizados em ratos, novamente em modelos experimentais de choque hemorrágico, confirmaram a melhora nas lesões intestinais e pulmonares além da diminuição da atividade inflamatória sistêmica nos animais que haviam recebido SSH e pentoxifilina quando comparados aos animais nos quais foi administrado Ringer lactato<sup>60,61</sup>.

---

O atual estudo apresentou resultados similares a outros encontrados na literatura médica, e também revelou novos achados que podem contribuir para um aperfeiçoamento do tratamento da lesão de I/R hepática. Para a avaliação da intensidade da lesão hepática, no presente estudo foram utilizados os níveis séricos de AST e ALT. Em relação ao emprego da SSH, Nishimura et al.<sup>62</sup> demonstraram a relação entre os níveis de AST e a extensão da área de necrose em fígado de ratos, comprovando a atenuação da lesão de I/R hepática com a administração da solução hipertônica. Figueira et al.<sup>43</sup> publicaram resultados semelhantes, em concordância com outros autores<sup>63</sup>. Nosso trabalho confirmou os resultados acima para a avaliação de AST no período de quatro e 12 horas após a reperfusão, revelando níveis de transaminases estatisticamente menores nos animais que receberam SSH, com e sem pentoxifilina. Contudo, não se observaram os mesmos resultados para a ALT na avaliação mais tardia, doze horas após a reperfusão (Figura 8).

Outro dado relevante com relação às transaminases foi o fato da adição da pentoxifilina não acarretar benefício em relação à SSH isolada. Especulamos que os efeitos da adição da pentoxifilina no tratamento da I/R hepática relacionados aos níveis de transaminases sejam sobrepostos e não sinérgicos a SSH, uma vez que, outros autores demonstraram resultados satisfatórios com a utilização isolada das drogas<sup>26,34,63</sup>.

---

Com a reperfusão, há um agravamento da lesão sinusoidal, mediado pelas ERO, acarretando diminuição da luz capilar, aumento na adesão e ativação de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios. Esta cascata inflamatória é deletéria tanto para o fígado como para outros órgãos<sup>64</sup>. A intensidade da resposta inflamatória pode ser avaliada através da determinação sérica de mediadores inflamatórios circulantes como IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$ .

Embora o fígado seja fundamental na produção e clareamento da IL-6, seu papel na I/R hepática ainda permanece obscuro<sup>65</sup>. Os trabalhos demonstram tanto características pró-inflamatórias como antiinflamatórias desta citocina<sup>65,66</sup>. Em concordância com outros autores, que observaram níveis 36% menores de IL-6 nos animais que receberam SSH e pentoxifilina quando comparados aos animais que receberam Ringer lactato, no presente estudo verificamos níveis significativamente menores de IL-6, 12 horas após a reperfusão nos animais tratados com a associação da SSH e pentoxifilina quando comparados com os outros grupos (Figura 9)<sup>67</sup>. Uma das hipóteses para este achado seria um provável aumento na produção de IL-6 com a utilização da solução fisiológica, que desempenharia, neste caso, um papel pró-inflamatório, mediada pelos ativadores da transcrição 3 (STAT3)<sup>68</sup>.

Em trabalho anterior de nosso laboratório, com o emprego exclusivo da SSH não se havia observado diferença estatisticamente significante nos níveis de IL-6 entre os grupos estudados no período de 4 horas, diferentemente dos achados do presente estudo, onde a IL-6 foi dosada mais tardiamente, 12 horas após a reperfusão, denotando maior efeito do



---

emprego da SSH nos períodos mais tardios após a reperfusão<sup>43</sup>. A adição da pentoxifilina não acarretou diferença estatisticamente significativa quando comparada com a SSH isolada.

A associação entre a liberação de IL-10 e a reperfusão hepática já foi comprovada previamente em estudo clínico<sup>69</sup>. A IL-10 apresenta propriedade imunossupressora, e foi estudada por muitos autores como uma citocina anti-inflamatória<sup>70,71</sup>. Possivelmente o mecanismo de atenuação da resposta inflamatória pelo IL-10 estaria relacionado com a supressão da ativação da NF- $\kappa$ B, molécula de transcrição de citocinas inflamatórias<sup>72</sup>. Entretanto, nosso estudo não revelou diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de IL-10 entre os grupos estudados.

O aumento da quantidade de mediadores pró-inflamatórios na corrente sangüínea ocasiona lesões à distância, sendo o pulmão um dos principais órgãos atingidos<sup>73</sup>. Ou seja, as repercussões das lesões de isquemia e reperfusão hepáticas não se restringem ao fígado, sendo capazes de alterar órgãos distantes que não foram submetidos à isquemia<sup>74</sup>. A lesão pulmonar é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e pelo aparecimento de edema tecidual, traduzida clinicamente como síndrome da angústia respiratória do adulto. A extração do azul de Evans no pulmão e a dosagem tecidual de mieloperoxidase refletem a intensidade da lesão de I/R neste órgão.

---

No atual estudo, o teste do azul de Evans demonstrou que, na fase mais precoce da I/R hepática (quatro horas), houve redução significativa da permeabilidade pulmonar com o emprego da SSH com ou sem a associação da pentoxifilina em relação aos grupos controle e SSF. A avaliação ainda nesta fase demonstrou menor permeabilidade pulmonar no grupo HPTX em relação ao grupo SSH, porém sem atingir significância estatística. À medida que o tempo após a reperfusão progride (12 horas), a avaliação da permeabilidade pulmonar no grupo HPTX passa a exibir resultados significativamente menores em relação ao grupo SSH.

Tanto a pentoxifilina como a SSH apresentam, isoladamente, benefícios em atenuar a intensidade da resposta inflamatória pulmonar em modelos experimentais com I/R sistêmicas<sup>75-77</sup>. Yada-Langui et al.<sup>50</sup> demonstraram que ratos submetidos a choque hemorrágico e tratados com SSH e pentoxifilina apresentaram diminuição do recrutamento de polimorfonucleares na membrana alvéolo-capilar diminuindo a intensidade da lesão pulmonar com o emprego das duas drogas.

A atenuação da lesão pulmonar está relacionada com a diminuição da expressão de ICAM-1, reduzindo, desta forma, o recrutamento de polimorfonucleares no pulmão<sup>77</sup>. O ICAM-1 mantém relação direta com a produção de mediadores inflamatórios que é limitada pelo emprego da pentoxifilina<sup>78</sup>. Com a adição da pentoxifilina a SSH observou-se redução significativa da permeabilidade pulmonar no período de 12 horas avaliada pelo teste do azul de Evans (Figura 11), sem alterar, no entanto, a infiltração leucocitária avaliada pela dosagem tecidual da mieloperoxidase pulmonar

---

(Figuras 12 e 13). É possível que, a adição da pentoxifilina, apesar de não alterar a infiltração leucocitária, possa ter reduzido “*in loco*” a produção de citocinas pró-inflamatórias. Com efeito, trabalho recente de nosso laboratório demonstrou que na pancreatite aguda experimental, a administração da SSH não influenciou o seqüestro leucocitário no pâncreas (avaliado pela dosagem de mileoperoxidase pancreática), porém, reduziu a produção “*in situ*” das citocinas pró-inflamatórias<sup>79</sup>.

A importância da avaliação da respiração mitocondrial na lesão de I/R hepática foi demonstrada por Jassen et al.<sup>80</sup>, que destacou os efeitos de fatores não-imunológicos na sobrevida do enxerto. A respiração mitocondrial depende da produção de ATP vinculada ao acoplamento da reação de oxidação da nicotinamida-adenina dinucleotídeo à fosforilação da adenosina difosfato (ADP), sendo todo o processo dependente de oxigênio. A I/R hepática leva à lesão mitocondrial com interrupção da produção energética essencial para funções celulares. Com a reperfusão hepática e oferta de oxigênio, a liberação de ERO causa a peroxidação lipídica comprometendo ainda mais o funcionamento da cadeia respiratória na respiração mitocondrial<sup>81,82</sup>. No atual estudo, notou-se, nos lobos isquêmicos, dos grupos controle e SSF maior degradação da oxidação e fosforilação mitocondriais e diminuição da respiração ativada com adição de ADP quando comparados com os grupos SSH e HPTX, indicando efeito protetor destas drogas sobre a função mitocondrial (Figuras 14, 16, 18).

---

O mesmo padrão foi observado na relação ADP/O nos animais dos grupos que receberam SSH e HPTX quando comparados aos outros dois grupos. Estes resultados foram os únicos referentes à respiração mitocondrial observados tanto no lobos isquêmicos como nos não-isquêmicos (Figuras 20 e 21). Tais achados corroboraram com estudos anteriores que demonstraram que, uma das possíveis ações da SSH é a expansão da volemia e, conseqüentemente melhora da perfusão tecidual<sup>38</sup>.

A adição da pentoxifilina a SSH resultou em níveis significativamente menores na dosagem de malondialdeído (avaliada pelo TBARS), em relação aos demais grupos, tanto no lobo isquêmico quanto no lobo não-isquêmico (Figuras 22 e 23). O malondialdeído é um subproduto da peroxidação lipídica, portanto expressa indiretamente a intensidade do estresse oxidativo e a repercussão local da intensidade da I/R. A peroxidação lipídica está presente nas duas fases da reperfusão uma vez que é dependente da liberação das ERO, mas principalmente na fase mais precoce da reperfusão através da oxidação da hipoxantina pela xantina-oxidase<sup>83</sup>.

Os achados, apesar de serem similares a estudo realizado em I/R sistêmica, contrapõe-se ao trabalho conduzido por Demir et al.<sup>84</sup> em I/R hepática, que não observaram diminuição na dosagem tecidual de MDA com o emprego isolado da pentoxifilina<sup>59</sup>. No entanto, o modelo citado acima foi realizado com a administração da pentoxifilina antes do período de isquemia, que, por sua vez foi realizada pelo período de apenas 30 minutos<sup>84</sup>.

---

A avaliação histológica representada pelo escore do estudo conduzido por Quireze et al.<sup>85</sup> revelou que, no período de quatro horas após a reperfusão, houve escore significativamente menor nos lobos isquêmicos dos ratos que receberam SSH isolada ou associada a pentoxifilina quando comparados ao grupo controle (Figura 24). O achado é concordante com estudo anterior de nosso laboratório, ocasião na qual especulamos se uma avaliação histológica mais tardia, superior a quatro horas, manteria a diferença estatística entre os grupos de animais estudados<sup>43</sup>. Esta hipótese, no entanto, não se comprovou pelos resultados do atual trabalho, quando avaliamos a histologia em 12 e 24 horas e não verificamos diferença estatística entre os grupos (Figura 25 e 26).

Foram realizadas as análises histológicas dos lobos hepáticos não submetidos à isquemia, porém, observou-se mínima lesão histológica em todos os grupos (escore 0).

Além de seus efeitos hemorreológicos e aumento na produção de PGE<sub>2</sub>, um dos mecanismos de ação da pentoxifilina nas lesões resultantes da isquemia/reperfusão hepática está ligado à inibição da ativação do NF-κB e, portanto, da transcrição do gene do TNF $\alpha$ <sup>57</sup>. O resultado final é a diminuição da ativação das células de Kupffer com minimização do processo inflamatório e da produção de ERO.

O presente trabalho vislumbra novas perspectivas para o entendimento dos efeitos da associação da SSH associada a pentoxifilina na I/R hepática. Com a redução estatisticamente significativa da peroxidação lipídica em todo o fígado, submetido ou não à isquemia, no grupo em que

---

associamos as duas drogas, alcançamos maior redução da intensidade do estresse oxidativo. É possível, portanto, que a adição da pentoxifilina a SSH influencie, também, a fase mais precoce do processo de I/R hepática, período em que há intensa produção de ERO, atuando, deste modo, em todas as etapas do evento.

Em resumo, a adição de pentoxifilina a solução salina hipertônica além dos benefícios já conhecidos desta última, significativamente reduziu a peroxidação lipídica no fígado, sugerindo uma redução na produção de ERO além de reduzir as lesões pulmonares. Estes dados associados a outros relacionados ao uso desta combinação no tratamento de choque hemorrágico justificam a sua aplicação em cirurgia hepática dentro de protocolos clínicos bem elaborados.

## **6. CONCLUSÕES**

## *Conclusões*

---

Nas condições do presente trabalho pode-se concluir que a administração endovenosa da solução salina hipertônica associada a pentoxifilina na I/R hepática resultou em:

- Redução da resposta inflamatória sistêmica;
- Redução das lesões histológicas e funcionais do fígado;
- Redução do estresse oxidativo no fígado;
- Redução da permeabilidade pulmonar precoce e tardia.



## **7 ANEXOS**

*Anexos*

---

**Anexo A.** Valores séricos de AST 4 horas após a reperfusão.

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	2460	1660	1610	1860
2	12700	3960	1900	1980
3	2620	4060	1850	1440
4	6380	2000	1840	1700
5	4500	2000	1650	1990
6	5230	1870	1850	1870
7	3870	2060	1630	1680
8		2040	1890	1800
9		1880	1880	1510
10		1430	1610	1990
11		1880	1910	1780
12		1860	1950	1990
13		1970	1910	1600
<b>Média</b>	<b>5394</b>	<b>2205</b>	<b>1806</b>	<b>1784</b>
<b>EP</b>	<b>1326</b>	<b>227,1</b>	<b>35,89</b>	<b>52,15</b>

**Anexo B.** Valores séricos de AST 12 horas após a reperfusão.

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	1320	1010	940	1310
2	490	1210	930	860
3	930	1980	690	950
4	970	1520	1220	1200
5	1030	1790	810	1600
6	1050	1860	740	1470
7	990	720	690	680
8	640	740	950	660
9	1120	1000	730	1400
10	730	1620	1130	810
11	910	1310	450	1520
12	1090	1480	1110	650
13	1220	1060	1240	840
14	5930	1330	1180	1050
15		1790	1310	1280
16		1410	1230	1040
17		1300	970	690
18		1230	610	1240
<b>Média</b>	<b>1316</b>	<b>1353</b>	<b>940,6</b>	<b>1069</b>
<b>EP</b>	<b>359,8</b>	<b>86,62</b>	<b>59,63</b>	<b>75</b>

*Anexos*

---

**Anexo C.** Valores séricos de ALT 4 horas após a reperfusão.

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	2520	1380	2310	1440
2	12540	4980	2060	1920
3	2620	4720	2540	2860
4	6580	1760	2030	2250
5	3660	2670	1990	3100
6	5230	4110	2460	2400
7	3870	2870	2570	2510
8		2700	1760	2110
9		1590	2180	1800
10		3730	1630	2810
11		1890	2320	2000
12		2540	2530	1480
13		3590	1680	1480
<b>Média</b>	<b>5289</b>	<b>2964</b>	<b>2158</b>	<b>2166</b>
<b>EP</b>	<b>1325</b>	<b>328</b>	<b>91,81</b>	<b>152,8</b>

**Anexo D.** Valores séricos de ALT 12 horas após a reperfusão.

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	2160	720	780	1000
2	800	720	540	620
3	430	2610	930	590
4	1220	1280	1000	1050
5	210	1350	600	1020
6	1400	2380	410	650
7	880	440	750	410
8	760	390	530	880
9	810	610	930	680
10	970	420	320	1240
11	350	1110	1060	450
12	620	1300	1360	1480
13	1330	590	1420	590
14	820	760	180	670
15		1360	1180	1300
16		220	990	650
17		1190	1390	520
18		1120	1050	1170
<b>Média</b>	<b>911,4</b>	<b>1032</b>	<b>856,7</b>	<b>831,7</b>
<b>EP</b>	<b>133,6</b>	<b>152,6</b>	<b>87,13</b>	<b>75,23</b>

*Anexos*

---

**Anexo E.** Valores séricos de Interleucina 6.

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	48	42	43	72
2	166	57	0	65
3	180	191	0	37
4	70	210	0	46
5	207	46	107	61
6	154	242	0	0
7		0	31	0
8		139	0	62
9		64	31	61
10		56	0	0
<b>Média</b>	<b>137,5</b>	<b>104,7</b>	<b>21,2</b>	<b>40,4</b>
<b>EP</b>	<b>26</b>	<b>26,5</b>	<b>10,92</b>	<b>9,34</b>

**Anexo F.** Valores séricos de Interleucina 10.

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	28	41	0	63
2	0	0	30	0
3	0	0	0	0
4	52	0	37	0
5	35	38	38	0
6	0	47	0	38
7		0	0	35
8		0	30	43
9		0	0	0
10		0	0	0
<b>Média</b>	<b>19,17</b>	<b>12,6</b>	<b>13,5</b>	<b>17,9</b>
<b>EP</b>	<b>9,145</b>	<b>6,452</b>	<b>5,568</b>	<b>7,6</b>

*Anexos*

---

**Anexo H. Dosagens de azul de Evans no pulmão em 4 horas**

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	368,6	134,06	298,15	127,08
2	565,68	108,23	16,3	25,76
3	344,76	698,65	160,52	215,85
4	165,06	539,51	11,1	373,03
5	535,62	381,08	372,84	119,74
6	937,66	442	308,91	45,07
7		569,23	431,76	227,96
8		955,67	421,76	213,16
9		442,67	297,06	105,4
10		308,6	283,63	222,55
<b>Média</b>	<b>486,2</b>	<b>458</b>	<b>260,2</b>	<b>167,6</b>
<b>EP</b>	<b>107,9</b>	<b>80,32</b>	<b>47,77</b>	<b>32,69</b>

**Anexo H. Dosagens de azul de Evans no pulmão em 12 horas**

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	310,29	70,59	64,2	38,07
2	110,13	70,53	131,88	51,9
3	166,87	72,73	66,96	2,7
4	39,34	45,12	102,42	33,33
5	33,55	31,88	75	17,91
6	95,1	30,43	2	56,73
7	52,5	108,99	28,77	78,72
8	125,84	88,66	84,57	54,76
9	116,33	49,26	95,3	2
<b>Média</b>	<b>116,7</b>	<b>63,13</b>	<b>72,34</b>	<b>37,35</b>
<b>EP</b>	<b>28,29</b>	<b>8,756</b>	<b>12,95</b>	<b>8,698</b>

*Anexos*

---

**Anexo I.** Dosagens de mieloperoxidase no pulmão em 4 horas

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	0,091	0,046	0,051	0,059
2	0,095	0,062	0,061	0,081
3	0,07	0,046	0,065	0,044
4	0,036	0,05	0,075	0,07
5	0,095	0,172	0,04	0,047
6	0,089	0,024	0,037	0,033
7		0,07	0,041	0,025
8		0,075	0,036	0,085
9		0,098	0,039	0,051
<b>Média</b>	<b>0,07933</b>	<b>0,07144</b>	<b>0,04944</b>	<b>0,055</b>
<b>EP</b>	<b>0,009461</b>	<b>0,0144</b>	<b>0,004767</b>	<b>0,006874</b>

**Anexo J.** Dosagens de mieloperoxidase no pulmão em 12 horas

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	0,06	0,09	0,072	0,035
2	0,106	0,05	0,074	0,081
3	0,18	0,14	0,092	0,08
4	0,08	0,045	0,081	0,038
5	0,125	0,15	0,047	0,046
6	0,12	0,145	0,04	0,038
7	0,026	0,03	0,062	0,09
8	0,034	0,026	0,047	0,041
9	0,17	0,03	0,051	0,028
<b>Média</b>	<b>0,1001</b>	<b>0,07844</b>	<b>0,06289</b>	<b>0,053</b>
<b>EP</b>	<b>0,01833</b>	<b>0,01781</b>	<b>0,005955</b>	<b>0,007883</b>

*Anexos*

---

**Anexo K.** Valores médios do S3 – lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	29,86	29,48	50,07	48,2
2	11,93	32,07	29,83	39,46
3	43,36	30,12	59,44	34,9
4	17,06	22,81	63,12	50,46
5	33,26	19,97	30,18	29,03
6	6,66	31,22	37,45	47,11
<b>Média</b>	<b>23,69</b>	<b>27,61</b>	<b>45,02</b>	<b>41,53</b>
<b>EP</b>	<b>5,741</b>	<b>2,034</b>	<b>5,97</b>	<b>3,463</b>

**Anexo L.** valores médios do S3 – lobo não-isquêmico

<b>N</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	48,21	28,85	39,46	38,92
2	25,19	36,96	25,89	24,07
3	46,79	50,88	39,14	29,86
4	18,96	41,77	53,11	46,66
5	30,74	25,2	27,78	23,7
6	13,05	45,67	24,42	32,14
<b>Média</b>	<b>45,02</b>	<b>41,53</b>	<b>34,97</b>	<b>32,56</b>
<b>EP</b>	<b>5,97</b>	<b>3,463</b>	<b>4,517</b>	<b>3,639</b>

*Anexos*

---

**Anexo M.** valores médios do S4 – lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	13,65	14,74	20,03	16,87
2	8,59	17,96	12,43	17,06
3	21,68	14,65	22,93	15,7
4	8,94	13,52	18,04	20,64
5	12,29	11,98	13,05	11,91
6	5,44	17,34	14,65	21,42
<b>Média</b>	<b>11,77</b>	<b>15,03</b>	<b>16,86</b>	<b>17,27</b>
<b>EP</b>	<b>2,311</b>	<b>0,9261</b>	<b>1,706</b>	<b>1,414</b>

**Anexo N.** valores médios do S4 – lobo não-isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	20,45	13,4	14,35	14,6
2	12,59	19,01	11,65	12,52
3	18,23	13,02	15,66	13,86
4	11,38	19,55	16,86	15,59
5	13,04	12,14	11,36	9,48
6	6,64	20,41	14,65	17,67
<b>Média</b>	<b>13,72</b>	<b>16,26</b>	<b>14,09</b>	<b>13,95</b>
<b>EP</b>	<b>2,025</b>	<b>1,541</b>	<b>0,893</b>	<b>1,14</b>



*Anexos*

---

**Anexo O.** Valores da razão do controle respiratório lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	2,19	2	2,5	2,86
2	1,39	1,78	2,4	2,31
3	2	2,06	2,59	2,22
4	1,91	1,69	3,5	2,44
5	2,71	1,67	2,31	2,44
6	1,22	1,8	2,56	2,2
<b>Média</b>	<b>1,903</b>	<b>1,833</b>	<b>2,643</b>	<b>2,412</b>
<b>EP</b>	<b>0,2216</b>	<b>0,06591</b>	<b>0,1765</b>	<b>0,09908</b>

**Anexo P.** Valores da razão do controle respiratório lobo não-isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	2,36	2,15	2,75	2,67
2	2	1,94	2,22	1,92
3	2,57	2,17	2,5	2,15
4	1,67	2,14	3,15	2,74
5	2,36	2,08	2,44	2,5
6	1,86	2,24	1,67	1,82
<b>Média</b>	<b>2,137</b>	<b>2,12</b>	<b>2,455</b>	<b>2,3</b>
<b>EP</b>	<b>0,1415</b>	<b>0,04171</b>	<b>0,2036</b>	<b>0,16</b>

*Anexos*

---

**Anexo Q.** Valores da razão ADP/consumo de oxigênio mitocondrial lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	1,79	1,67	1,97	1,97
2	0,98	1,74	1,88	1,91
3	1,79	1,66	1,88	1,76
4	1,76	1,74	1,91	1,97
5	1,76	1,79	1,85	1,91
6	1,48	1,67	1,97	1,97
<b>Média</b>	<b>1,593</b>	<b>1,712</b>	<b>1,91</b>	<b>1,915</b>
<b>EP</b>	<b>0,1319</b>	<b>0,02151</b>	<b>0,02049</b>	<b>0,03324</b>

**Anexo R.** Valores da razão ADP/consumo de oxigênio mitocondrial lobo não-isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	1,79	1,74	1,91	1,97
2	1,79	1,79	1,97	1,76
3	1,74	1,79	1,97	1,91
4	1,64	1,79	1,91	1,91
5	1,82	1,79	1,85	1,82
6	1,64	1,74	1,97	1,91
<b>Média</b>	<b>1,737</b>	<b>1,773</b>	<b>1,93</b>	<b>1,88</b>
<b>EP</b>	<b>0,03232</b>	<b>0,01054</b>	<b>0,02</b>	<b>0,03098</b>

*Anexos*

---

**Anexo S.** Dosagem de malondialdeído no lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	1,35	0,74	1,38	0,4
2	2,1	0,91	1,2	0,56
3	0,67	0,5	1,3	0,63
4	0,52	3,06	1,2	0,6
5	0,94	0,5	1,5	0,39
6	2,1	0,56	1,6	0,31
7		0,96	1,5	0,42
8		0,74	1,1	0,35
<b>Média</b>	<b>1,2837</b>	<b>0,9963</b>	<b>1,348</b>	<b>0,4575</b>
<b>EP</b>	<b>0,85</b>	<b>0,3012</b>	<b>0,06244</b>	<b>0,04292</b>

**Anexo T.** Dosagem de malondialdeído no lobo não- isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	2	0,2	1,11	0,03
2	2,34	0,48	1,18	0,14
3	1,64	0,83	1,1	0,02
4	0,5	2,77	1,2	0,3
5	2,2	0,25	1,41	0,17
6	2	0,37	1,42	0,53
7		2	0,9	0,37
8		0,85	1,23	0,3
<b>Média</b>	<b>1,78</b>	<b>0,9688</b>	<b>1.194</b>	<b>0,2325</b>
<b>EP</b>	<b>0,2735</b>	<b>0,3286</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06198</b>

*Anexos*

---

**Anexo U.** Histologia 4 horas lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	5	9	4	7
2	15	12	8	9
3	9	8	7	7
4	9	7	5	4
5	13	8	4	8
6	16	9	6	8
7		5	4	8
8		8	8	6
<b>Mediana</b>	<b>11</b>	<b>8,25</b>	<b>5,7</b>	<b>7,1</b>
<b>EP</b>	<b>1,721</b>	<b>0,7</b>	<b>0,61</b>	<b>0,54</b>

**Anexo V.** Histologia 12 horas lobo isquêmico

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
1	9	6	5	3
2	2	6	15	8
3	3	6	12	12
4	21	3	3	8
5	21	16	12	12
6	17	11	8	4
7		14	12	4
8		11	12	12
<b>Mediana</b>	<b>13</b>	<b>8,5</b>	<b>12</b>	<b>8</b>
<b>EP</b>	<b>3,5</b>	<b>1,6</b>	<b>1,45</b>	<b>1,36</b>

**Anexo W. Histologia 24 horas lobo isquêmico**

<b>n</b>	<b>ST</b>	<b>SSF</b>	<b>SSH</b>	<b>HPTX</b>
<b>1</b>	0	12	9	0
<b>2</b>	13	9	12	10
<b>3</b>	8	9	8	0
<b>4</b>	12	15	8	11
<b>5</b>	10	18	12	14
<b>6</b>	16	6	14	12
<b>Mediana</b>	<b>11</b>	<b>10,5</b>	<b>10,5</b>	<b>10,5</b>
<b>EP</b>	<b>2,25</b>	<b>1,8</b>	<b>1,02</b>	<b>2,53</b>

## **8. REFERÊNCIAS**

*Referências*

---

1. Pringle JH. Notes on the arrest hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg.* 1908;48(4):541-9.
2. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg.* 1999;229(3):369-75.
3. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg.* 1975;129(5):513-7.
4. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1240-6.
5. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991;260(3 pt 1):G355-G62.
6. Pegg DE. Organ preservation. *Surg Clin North Am.* 1986;66(3):617-32.
7. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology.* 2003;125(5):1480-91.
8. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg.* 1991;213(2):137-42.
9. Arai S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2003;10(3):189-94.
10. Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS. Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2005;11(6):663-8.

*Referências*

---

11. Adkison D, Höllwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548(1):101-7.
12. Rizzardini M, Zappone M, Villa P, Gnocchi P, Sironi M, Diomede L, Meazza C, Monshouwer M, Cantoni L. Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1beta. *Hepatology.* 1998;27(3):703-10.
13. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, Mc Masters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000;32(2):169-73.
14. Shiatori Y, Ohmura K, Hikiba Y, Matsumura M, Nagura T, Okano K, Kamii K, Omata M. Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells. *Dig Dis Sci.* 1998;43(8):1737-45.
15. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J.* 1999;13(2):253-61.
16. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology.* 2002;122(1):202-10.
17. Farhood A, Mc Guire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol.* 1995;57(3):368-74.
18. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie JE, Warner RL, Ward PA. P-selectin and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg.* 2000;191(4):395-402.



*Referências*

---

19. Ishizaki N, Zhu Y, Zhang S, nemoto A, kobayashi Y, Subbotin V, Starzl T, Todo S. Comparison various lazaroid compounds for protection against ischemia liver injury. *Transplantation*. 1997;63(2):202-8.
20. Yokota R, Fukai M, Shimamura T, Susuki T, Watanabe Y, Nagashima K, Kishida A, Furukawa H, Hayashi T, Todo S. A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery*. 2000;127(1):661-9.
21. Zar H, Tanigawa K, Kim Y, Lancaster JR. Rat liver postischemic peroxidation and vasoconstriction depends on ischemia time. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(3):255-64.
22. Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Meow Dg, Dreier J, Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(2):195-205.
23. Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe D. Ischemic preconditioning alters real time measure of O<sup>2</sup> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*. 2003;284(2):H566-74
24. Walker LM, York J, Imam SZ, Ali SF, Muldrew KL, Mayeux PR. Oxidative stress and nitrogen reactive species generation during renal ischemia. *Toxicol Sci*. 2001;63(1):143-8.
25. Fukai M, Hayashi T, Yokota R, Shimamura T, susuki T, Tanigushi M, Matsushita M, Furukawa H, Todo. Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(10):1372-81.
26. Coletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1996;23(3):506-14.

27. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: A review. *Liver Transpl.* 2005;11(9):1031-47.
28. Till GO, Beauchamp C, Menapace D, Tourtellotte WJr, Kunkel R, Johnson KJ, Ward PA. Oxygen radical dependent lung damage following thermal injury of rat skin. *J Trauma.* 1983;23(4):269-77.
29. Moussa ME, Sarraf CE, Uemoto S, Sawada H, Habib NA. Effect of total hepatic vascular exclusion during liver resection on hepatic ultrastructure. *Liver Transpl Surg.* 1996;2(6):461-7.
30. Jaeschke H. molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:G15-G26.
31. Hirsch J, Hansen KC, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts JP, Matthay MA, Burlingame AL, Maher JJ, Niemann CU. Warm ischemia-induced in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffers cells in rats. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(6):979-86.
32. Platz KP, Mueller AR, Schäfer C, Jahns S, Guckelberger O, Neuhaus P. Influence of warm ischemia time on initial graft function in human liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997;29(8):3458-9.
33. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg.* 2003;238(6):843-50.
34. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF, Rossi B, Gugenheim J. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford).* 2007;9(2):112-9.

*Referências*

---

35. Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, Evers MF. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. *J Trauma*. 1997;42(4):602-6.
36. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005;60(2):159-72.
37. Varicoda EY, Poli de Figueiredo LF, Cruz RJ Jr, Silva LE, Rocha e Silva M. Blood loss after fluid resuscitation with isotonic or hypertonic saline for the initial treatment of uncontrolled hemorrhage induced by spleen rupture. *J Trauma*. 2003;55(1):112-7.
38. Velasco I, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1980;239(5):H664-H73.
39. Garrido Adel P, Cruz RJ jr, Poli de Figueiredo LF, Rocha e Silva M. Small volume of hypertonic saline as the initial fluid replacement in experimental hypodynamic sepsis. *Crit Care*. 2006;10(2):R62.
40. Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJ Jr, Sannomiya P, Rocha-E-Silva M. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6(2):201-6
41. Powers KA, Zurawska J, Szaszi K, Khadaroo RG, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/reperfusion. *Surgery*. 2005;137(1):66-74.
42. Oreopoulos GD, Wu H, Szaszi K, Fan J, Marshall JC, Khadaroo RG, He R, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin 10. *Hepatology*. 2004;40(1):211-20.

*Referências*

---

43. Figueira ER, Bacchella T, Coelho AM, Sampietre SN, Molan NA, Leitão RM, Machado MC. Timing-dependent protection of hypertonic saline solution administration in experimental liver ischemia/reperfusion injury. *Surgery*. 2010;147(3):415-23.
44. Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline infusion for pulmonary injury due to ischemia reperfusion. *Arch Surg*. 2003;138(1):9-14.
45. Sun LL, Ruff P, Austin B, Deb S, Martin B, Burriss D, Rhee P. Early up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 expression in rats with hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*. 1999;11(6):416-22.
46. Kozaki K, Matsuno N, Kozaki M. Beneficial effects of pentoxifylline and propentoxifylline on preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplant Proc*. 1996;28(1):333-4.
47. Kozaki K, Egawa H, Bermudes L, Keefe EB, So SK, Esquivel CO. Effect of pentoxifylline pretreatment on Kupffer cells in rat liver transplantation. *Hepatology*. 1995;121(4):1079-82.
48. Adams J, Dhar A, Shukla S, Silver D. Effect of pentoxifylline on tissue injury and platelet-activating factor production during ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 1995;21(5):742-8.
49. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery*. 1991;110(2):192-8.
50. Yada-Langui MM, Coimbra R, Lancellotti C, Mimica I, Garcia C, Correia N Jr, Rocha e Silva M. Hypertonic saline and pentoxifylline prevent lung injury and bacterial translocation after hemorrhagic shock. *Shock*. 2000;14(6):594-8.

*Referências*

---

51. Cruz RJ Jr, Yada-Langui MM, de Figueiredo LF, Sinosaki S, Rocha e Silva M. The synergistic effects of pentoxifylline on systemic and regional perfusion after hemorrhage and hypertonic resuscitation. *Anesth Analg.* 2006;102(5):1518-24.
52. Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of the Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg.* 1997;226(6):704-13.
53. Makuuchi M, Mori T, Gunven P, Yamazaki S, Hasagawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet.* 1987;164(2):155-8.
54. Wu CC, Hwang CR, Liu TL, Peng FK. Effects and limitations of prolonged ischemia for hepatic resection of the cirrhotic liver. *Br J Surg.* 1996;83(1):121-4.
55. Elias D, Desruennes E, Lasser P. Prolonged intermittent clamping of the portal triad during hepatectomy. *Br J Surg.* 1991;78(1):42-4.
56. Busuttil RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003;9(7):651-63.
57. Aslan A, Karaguzel G, Celik M, Uysal N, Yucel G, Melikoglu M. Pentoxifylline contributes to the hepatic cytoprotective process in rats undergoing hepatic ischemia and reperfusion injury. *Eur Surg Res.* 2001;33(4):285-90.
58. Nishizawa H, Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Yamaoka Y, Tanaka K. Efficiency of pentoxifylline in donor pretreatment in rat liver transplantation. *J Surg Res.* 1997;72(2):170-6.
59. Coimbra R, Loomis WH, Melbostad H, Tobar M, Porcides RD, Lall R, Holbrook T, Hoyt DB. Role of hypertonic saline and pentoxifylline on neutrophil activation and tumor necrosis factor-alpha synthesis: a novel resuscitation strategy. *J Trauma.* 2005;59(2):257-64.

- 
60. Coimbra R, Porcides R, Loomis WH, Melbostad H, Lall R, Deree J, Wolf P, Hoyt DB. HSPTX protects against hemorrhagic shock resuscitation-induced tissue injury: an attractive alternative to Ringer's lactate. *J Trauma*. 2006;60(1):41-51.
  61. Deree J, Martins JO, Leedom A, Lamon B, Putnam J, de Campos T, Hoyt DB, Wolf P, Coimbra R. Hypertonic saline and pentoxifylline reduces hemorrhagic shock resuscitation-induced pulmonary inflammation through attenuation of neutrophil degranulation and pro-inflammatory mediator synthesis. *J Trauma*. 2007;62(1):104-11.
  62. Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y. Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferases as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology*. 1986;6(4):701-7.
  63. Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, Fan J, Lu Z, Li YH, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity. *Shock*. 2000;14(3):409-14.
  64. El-Wahsh M, Seifalian AM, Fuller BJ, Rolles K, Davidson BR. Induction of adhesion molecule expression in liver ischaemia-reperfusion injury is associated with impaired hepatic parenchymal microcirculation. *Br J Surg*. 2004;91(8):1034-9.
  65. Camargo Jr CA, Madden JF, Gao W, Selvan SR, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. 1997;26(6):1513-20.
  66. Guidi L, Tricerri A, Constanzo M, Adducci E, Ciarniello M, Errani AR, De Cosmo G, Barattini P, Frasca D, Bartoloni C, Nuzzo G, Gasbarrini G. Interleukin-6 release in the hepatic blood outflow during normothermic liver ischemia in humans. *Dig Liver Dis*. 2003;35(6):409-15.

*Referências*

---

67. Deree J, Loomis WH, Wolf P, Coimbra R. Hepatic transcription factor activation and proinflammatory mediator production is attenuated by hypertonic saline and pentoxifylline resuscitation after hemorrhagic shock. *J Trauma*. 2008;64(5):1230-8.
68. Camargo Jr CA, Madden JF, Gao W, Selvan SR, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. 1997;26(6):1513-20.
69. Louis H, le Moine O, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldaman M, Deviere J. Hepatoprotective role of interleukin-10 in galactosemine/lypopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology*. 1997;112(3):935-42.
70. Zou XM, Yagihashi A, Hirata K, Tsuruma T, Matsuno T, Tarumi K, Asanuma K, Watanabe N. Down-regulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and prolongation of rat liver allograft survival by interleukin-10. *Surg today*. 1998;28(2):184-91.
71. Santucci L, Foirucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, Miglioratti G, Morelli A. Interleukin-10 reduces lethality and hepatic injury induced by lypopolysaccharide in galactosemine-sensitized mice. *Gastroenterology*. 1996;111(3):736-44.
72. Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor  $\kappa\beta$  independently of I  $\kappa\beta$  degradation. *Hepatology*. 1998;28(4):1022-30.
73. Kimura N, Muraoka R, Horiuchi T, Tabo T, Uchinami M, Yokomachi J, Doi K. Intermittent hepatic pedicle clamping reduces liver and lung injury. *J Surg Res*. 1998;78(1):11-7.
74. Ohashi I, Kaku R, Fuji H, Nakatsuka H, Matsumi M, Morita K. Severe acute pulmonary edema during living related liver transplantation surgery. *Masui*. 2004;53(8):925-8.

*Referências*

---

75. Coimbra R, Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Evers MF. Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage-induced immunosuppression by decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production. *J Surg Res.* 1996;64(2):203-9.
76. Angle N, Hoyt DB, Cabello-Passini R, Herdon-Remelius C, Loomis W, Junger WG. Hypertonic saline resuscitation reduces neutrophil margination by suppressing neutrophil L selectin expression. *J Trauma.* 1998;45(1):7-12.
77. Mandi Y, Nagy Z, Ocsovszki I, Farkas G. Effects of tumor necrosis factor and pentoxifylline on ICAM-1 expression on human polymorphonuclear granulocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;114(4):329-35.
78. Beck-Schimmer B, Schimmer RC, Warner RL, Schmall H, Nordblom G, Flory CM, Lesch ME, Friedl HP, Schrier DJ, Ward PA. Expression of lung vascular and airway ICAM-1 after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(3):334-52.
79. Coelho AM, Jukemura J, Sampietre SN, Martins JO, Molan NA, Patzina RA, Lindkvist B, Jancar S, Cunha JE, D'Albuquerque LA, Machado MC. Mechanisms of the beneficial effect of hypertonic saline solution in acute pancreatitis. *Shock.* 2010 Mar 23.
80. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;73(4):493-9.
81. de Felipe J Jr, Timoner J, Velasco IT, Lopes OU, Rocha-e-Silva M Jr. Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. *Lancet.* 1980;2(8202):1002-4.
82. Murao Y, Loomis W, Wolf P, Hoyt DB, Junger WG. Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock.* 2003;20(1):29-34.



*Referências*

---

83. Camargo Jr CA, Madden JF, Gao W, Selvan SR, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. 1997;26(6):1513-20.
84. Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia reperfusion injury. *Clin Chim Acta*. 1998;275(2):127-35.
85. Quireze C, Montero EF, Leitao RM, Juliano Y, Fagundes DJ, Poli-de-Figueiredo LF. Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia reperfusion injury in rats. *J Invest Surg*. 2006;19(4):229-36.