

LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICAS EM CÃES. ESTUDOS HISTOLÓGICOS SOBRE NECROSE HEPATOCÍTICA, CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E CONTAGEM TECIDUAL DE POLIMORFONUCLEARES

HEPATIC ISCHAEMIA AND REPERFUSION LESION IN THE DOG. INVESTIGATIONS
OF HEPATOCELLULAR NECROSIS, HEPATIC GLYCOGEN CONTENT AND
POLYMORPHONUCLEAR TISSUE CELLS COUNTING

Renato Dornelas Câmara Neto, TCBC-PE¹

Silvia Limongi Lopes²

Antônio Roberto de Barros Coelho¹

Ayrton Ponce de Souza, TCBC-PE³

Álvaro Antônio Bandeira Ferraz, TCBC-PE¹

Edmundo Machado Ferraz, TCBC-PE⁴

RESUMO: No transplante hepático, a fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão do fígado não é completamente conhecida. Várias preparações experimentais têm sido usadas para estudos de tal lesão. Para tal fim, no presente trabalho, um modelo modificado foi proposto e avaliado. Vinte cães mestiços, pesando $15,25 \pm 1,21$ kg, sob anestesia geral, foram distribuídos em dois grupos de investigação: 1. Grupo Teste (n = 10) – os animais foram submetidos a desvascularização de 70% da massa hepática, por período de noventa minutos, seguida de revascularização do fígado. Durante o período de isquemia, a descompressão venosa esplâncica foi realizada através dos lobos caudado e lateral direito; 2. Grupo Controle (n = 10) – os cães foram submetidos a operação simulada. Em todos os animais foram realizadas biópsias do fígado. O método foi avaliado através de determinações de Necrose Hepatocítica (NH), Conteúdo de Glicogênio Hepático (CGH) e Contagem Tecidual de Polimorfonucleares (CTPMN), realizadas aos cinco minutos antes da isquemia (T_0), cinco minutos antes da reperfusão (T_1) e uma hora (T_2) e cinco horas (T_3) após a reperfusão. Os resultados permitiram concluir com uma confiança de 95% que: 1. Houve aumento progressivo de intensidade de NH e diminuição do CGH durante os estágios de isquemia e de reperfusão hepáticas; 2. Não foi comprovada diferença significativa na CTPMN entre os grupos investigados. As alterações histológicas verificadas são indicativas de NH efetiva, decorrente de isquemia e reperfusão do fígado.

Unitermos: Fígado; Isquemia normotérmica; Reperfusão; Necrose hepatocítica; Glicogênio hepático; Neutrófilos polimorfonucleares; Cães.

INTRODUÇÃO

No transplante ortotópico de fígado, a lesão de isquemia e reperfusão hepáticas tem sido relacionada à disfunção primária do enxerto,¹⁻¹⁰ bem como a episódios de rejeição, à trombose da artéria hepática e à estenose das vias biliares.^{9,10} Em outras situações clínicas como traumatismo de fígado,

^{11,12,13} grandes ressecções hepáticas,¹¹⁻¹⁹ estado de choque^{12,17,20,21,22} e instabilidade hemodinâmica em doadores de órgãos,^{5,23-28} a redução do fluxo sanguíneo ao fígado pode induzir lesão de isquemia e reperfusão no tecido hepático.

A fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão hepáticas não está completamente elucidada, fato que tem justificado grande número de estudos experimentais e clínicos

1. Professor Adjunto, Doutor do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde, Hospital das Clínicas – UFPE.

2. Professor Adjunto, Doutor do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.

3. Professor dos Cursos de Pós-Graduação em Cirurgia, Doutor, Livre-Docente do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde do Hospital das Clínicas - UFPE.

4. Professor Titular, Doutor, Livre-Docente do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde do Hospital das Clínicas da UFPE.

Recebido em 12/11/98

Aceito para publicação em 20/5/99

Trabalho realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental do Depto. de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

realizados sobre o assunto.^{2,10,29-40} A condição histológica irreversível da lesão de isquemia e reperfusão hepáticas é representada pela morte celular por necrose ou por apoptose (Processo caracterizado morfológicamente por fragmentação nuclear e hidrólise de DNA, com conservação da membrana citoplasmática).^{41,42}

O presente trabalho tem como objetivo o estudo das lesões histológicas, por microscopia óptica, através de dados de Necrose Hepatocítica, Conteúdo de Glicogênio Hepático e Contagem Tecidual de Polimorfonucleares, decorrentes de isquemia e reperfusão do fígado produzidas em 70% da massa hepática, em um modelo experimental proposto para uso em cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte cães mestiços, de ambos os sexos, com peso corporal de $15,25 \pm 1,21$ kg, foram submetidos à anestesia geral, induzida com tiopental (4 a 6mg/kg) e conduzida com cetamina (1 a 2mg/kg) e pancurônio (0,1 a 0,2mg/kg), via intravenosa. Os animais foram entubados e submetidos à respiração controlada com volume corrente de 15ml/kg, FiO_2 de 21% e frequência respiratória de 16 ciclos/min.

Após abertura da cavidade abdominal, estes animais foram distribuídos em dois grupos experimentais:

1. Grupo Teste (n = 10) – Os ligamentos hepato-renal, triangular esquerdo, falciforme e gastro-hepático foram desconectados do fígado. O colédoco, as artérias hepática comum e gastroduodenal, assim como o ramo esquerdo da veia porta foram ocluídos, produzindo-se deste modo exclusão vascular normotérmica dos lobos medial direito (LMD), quadrado (LQ), medial esquerdo (LME), lateral esquerdo (LLE) e processo papilífero do lobo caudado (PPLC), constituindo 70% da massa hepática, por período de noventa minutos. Durante este período, a descompressão portal foi realizada pelo ramo direito da veia porta, através da permanência do lobo lateral direito e do processo caudado do lobo caudado, submetidos apenas à interrupção do fluxo arterial (Figura 1). O fluxo sanguíneo ao fígado era então restabelecido, e, logo após a reperfusão, procedia-se à exclusão vascular dos lobos hepáticos utilizados para descompressão esplâncnica. Após esses procedimentos, estes lobos foram ressecados, cauterizando-se a superfície hepática com bisturi a gás argônio.

2. Grupo Controle (n = 10) – Neste grupo, os animais foram apenas submetidos a dissecação e isolamento dos elementos anatômicos do pedículo hepático.

Em ambos os grupos, exames histológicos foram procedidos em fragmentos retirados do LME, nos seguintes tempos: cinco minutos antes da isquemia (T_0), cinco minutos antes da reperfusão (T_1), uma hora após reperfusão (T_2) e cinco horas após reperfusão (T_3). Os cortes histológicos foram corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e pela hematoxilina-eosina (HE).

Necrose hepatocítica (NH), conteúdo de glicogênio hepático (CGH) e contagem tecidual de polimorfonucleares

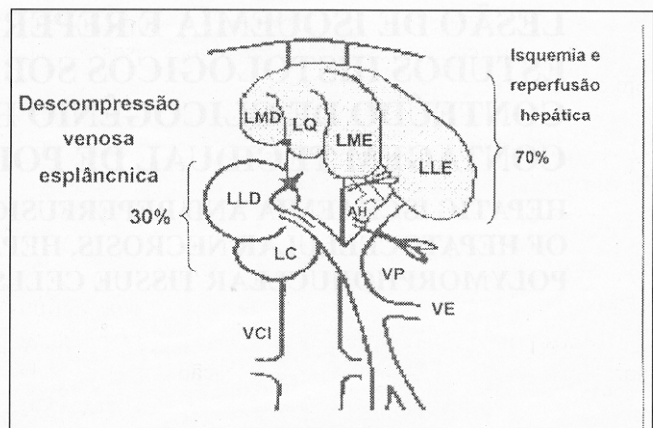


Figura 1 – Desenho representativo do modelo avaliado. VCI – Veia Cava Inferior; LC – Lobo Caudado; LLD – Lobo Lateral Direito; LMD – Lobo Medial Direito; LQ – Lobo Quadrado; LME – Lobo medial Esquerdo; LLE – Lobo Lateral Esquerdo; AH – Artéria Hepática; VP – Veia Porta; VE – Veia Esplênica

(CTPMN) foram avaliados. Em relação à NH, os achados foram transformados em valores percentuais representativos da intensidade da lesão do seguinte modo: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75% e (+++++) 100%. Quanto ao CGH, foi atribuído o valor de 1 (um) como representativo de positividade para o PAS e de 0 (zero) como expressão de negatividade do exame. A CTPMN foi procedida através de objetiva de grande aumento (400x), sendo estudados cinco campos (cga) selecionados subjetivamente de acordo com a aparência de uma maior densidade leucocitária, iniciando-se no campo inferior esquerdo e, em seguida, para cima e para baixo, em zig-zag, até o campo inferior direito, percorrendo-se desse modo toda a preparação.

Na análise estatística realizada com os dados de NH e CTPMN procedeu-se à aplicação do Teste "t" de Student bicaudal, de modo intragrupo e intergrupo. Para o estudo estatístico com dados de CGH, aplicou-se o teste do Chi-quadrado (χ^2), também de modo intragrupo e intergrupo. Em toda a análise estatística, a probabilidade de erro escolhida foi de 5%.

A experimentação foi conduzida seguindo-se os princípios do Código de Ética para pesquisas biomédicas em animais, da OMS (Howard-Jones NA. CIOMS ethical code for animal experimentation. *WHO Chronicle*, v. 39, n. 2, p. 51-56, 1985).

RESULTADOS

1. Necrose Hepatocítica (NH) – Houve necrose hepatocelular significativa, de intensidade progressivamente maior, na análise comparativa realizada com as médias dos valores obtidos nos animais do Grupo Teste nos tempos programados, após ter sido instituída a isquemia hepática (Tabela 1). A intensidade desta necrose alcançou valores médios de 85%

no tempo T₅ (Tabela 1). No Grupo Controle não ocorreu necrose hepática em nenhum dos tempos programados para estudo (Tabela 1). Desse modo, na comparação entre o Grupo Teste e o Grupo Controle foram evidenciadas diferenças significativas com relação a este parâmetro (Tabela 1), nos tempos analisados após a indução de isquemia hepática (Tabela 1). A necrose foi predominantemente de caráter centrolobular.

Tabela 1

Análise comparativa intragrupo (*) e intergrupo (†) entre as médias dos valores de Necrose Hepatocística (NH) (%), obtidos nas biópsias realizadas nos animais do grupo Teste e do Grupo Controle

GRUPOS	Parâmetros	TEMPOS			
		T ₀ 5 min Pré- isquemia	T ₁ 5 min Pré- reperusão	T ₂ 1 hora Pós- reperusão	T ₃ 5 horas Pós- reperusão
TESTE (n=10)	NH (%)	0,000 ± 0,000	32,500*† ±16,870	70,000*† ±15,810	85,000*† ±12,910
			32,500 ±16,879	70,000* ±15,810	85,000* ±12,910
CONTROLE (n=10)	NH (%)	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000

* p < 0,05
† p < 0,05

2. Conteúdo de Glicogênio Hepático (CGH) – No Grupo Teste, as médias dos valores de CGH, obtidos por escore, nos tempos T₁, T₂ e T₃, foram significativamente menores que aqueles determinados no tempo T₀ (Tabela 2).

De modo diverso, nos experimentos do Grupo Controle, não houve alterações significativas dos níveis médios de CGH, em qualquer dos tempos estudados (Tabela 2). Conseqüentemente ficou evidente a existência de diminuições significativas dos valores médios obtidos nos experimentos do Grupo Teste, quando comparado com aqueles obtidos nos experimentos do Grupo Controle (Tabela 2).

3. Contagem Tecidual de Polimorfonucleares (CTPMN)

– No Grupo Teste ficou evidenciada a ausência de diferenças estatisticamente significativas na CTPMN, durante o evoluer dos experimentos (Tabela 3), diversamente do que foi constatado nos experimentos do Grupo Controle (Tabela 3). Na análise comparativa intergrupo, não foram constatadas diferenças significativas com relação à CTPMN (Tabela 3).

Tabela 2

Análise comparativa intragrupo (*) e intergrupo (†) entre as médias dos valores de Conteúdo de Glicogênio Hepático (CGH), obtidos por escore* nas biópsias realizadas nos animais do grupo Teste e do Grupo Controle

GRUPOS	Parâmetros	TEMPOS			
		T ₀ 5 min Pré- isquemia	T ₁ 5 min Pré- reperusão	T ₂ 1 hora Pós- reperusão	T ₃ 5 horas Pós- reperusão
TESTE (n=10)	CGH (PAS)	1,000 ±0,000	0,100*† ±0,316	0,110*† ±0,330	0,000*† ±0,000
CONTROLE (n=10)	CGH (PAS)	0,900 ±0,320	0,000*† ±0,000	1,000*† ±0,000	1,000*† ±0,000

ISQUEMIA

REPERFUSÃO

* Positividade para PAS = 1
Negatividade para PAS = 0

* p < 0,05
† p < 0,05

Tabela 3

Análise comparativa intragrupo (*) e intergrupo (†) entre as médias dos valores da Contagem Tecidual de Polimorfonucleares (CTPMN), (avaliado em cinco campos de grande aumento – 400x), obtidos nas biópsias realizadas nos animais do grupo Teste e do Grupo Controle

GRUPOS	Parâmetros	TEMPOS			
		T ₀ 5 min Pré- isquemia	T ₁ 5 min Pré- reperusão	T ₂ 1 hora Pós- reperusão	T ₃ 5 horas Pós- reperusão
TESTE (n=10)	CTPM	13,260 ±14,123	23,140 ±13,215	31,520 ±15,220	49,511 ±31,655
CONTROLE (n=10)	CTPM	11,380 ±11,443	29,220* ±13,886	31,340* ±13,866	35,180* ±15,389

ISQUEMIA

REPERFUSÃO

* p < 0,05
† p < 0,05

Nas amostras de tecido hepático estudadas, a infiltração de PMN ocorreu no leito sinusoidal e na região subcapsular.

DISCUSSÃO

Necrose hepática tem sido utilizada para aferir intensidade das lesões de isquemia e de reperfusão, em modelos experimentais e em casos clínicos.^{8,22,31,43-50} Determinação de morte celular por necrose através de microscopia óptica tem sido reconhecida como parâmetro confiável por não estar sujeita às ambigüidades das alterações ultra-estruturais, devidas a erros de amostragens, possíveis de ocorrer em estudos realizados com microscopia eletrônica.⁴⁷ Contribuições recentes têm levantado a possibilidade de ocorrência de outro mecanismo de morte celular, representado por apoptose, que constituiria tipo de morte celular programada,^{41,42} caracterizada morfológicamente por fragmentação nuclear e hidrólise de DNA, com conservação da membrana citoplasmática. Ativação de apoptose tem sido demonstrada durante fase de reperfusão em fígados de ratos,⁴¹ havendo por isso recomendação para administração de compostos anti-apoptóticos como meio de prevenir tal tipo de lesão em transplante de fígado.⁴²

Os resultados do presente trabalho demonstraram ter ocorrido nos fígados dos cães do Grupo Teste, após indução da isquemia, necrose hepatocítica de intensidade variável porém progressivamente maior, com diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos valores desse parâmetro, obtidos em todos os tempos programados para estudo (Tabela 1). Neste Grupo, a intensidade da lesão necrótica induzida alcançou valores médios de 85% na quinta hora de reperfusão hepática (Tabela 1). Tempo de isquemia hepática de noventa minutos de duração, condição de normotermia na realização do procedimento, bem como supressão das principais vias acessórias de irrigação do fígado contribuíram, possivelmente, para obtenção desses resultados.

Nos animais do Grupo Controle não se verificou necrose hepatocítica em qualquer dos tempos estudados (Tabela 1). Desse modo, a comparação entre os dois grupos tornou evidente a diferença entre eles após ter sido praticada a isquemia (Tabela 1).

Na maioria dos nossos casos, a necrose verificada tinha localização centrolobular. A propósito, Parks e Granger referiram que os hepatócitos da zona centrolobular do ácido hepático eram mais sensíveis à hipóxia.⁵¹ Lesões necróticas mais evidentes em torno das veias centrolobulares também têm sido referidas, após reperfusão, em fígados de rato.⁴³

Tem sido referido que em modelo experimental de isquemia e reperfusão hepáticas, a pentoxifilina – droga de ação protetora de microcirculação e de ação anticitocinas – tem se mostrado capaz de reduzir a necrose em nível periportal, na primeira hora, bem como em nível periportal e pericentral, na quinta hora, após reperfusão.⁸ Em nosso laboratório, experimentos pilotos em cães vêm sendo desenvolvidos com utilização dessa droga em modelo de isquemia e reperfusão hepáticas semelhante ao aqui estudado.

Quanto ao conteúdo de glicogênio hepático, este parâmetro tem sido utilizado em procedimentos que estudam

isquemia e reperfusão de fígado, para avaliar a extensão da lesão hepatocelular ocorrida nesses casos e para prognosticar funcionamento de enxerto em transplante de fígado.^{7,52}

Glicogênio hepático tem sido reconhecido como importante fonte energética, sendo admitido também como capaz de exercer ação protetora sobre o fígado, contra lesões de isquemia e reperfusão,⁵² sobretudo quando isto se faz necessário em condições de anaerobiose.

A perda ou diminuição de glicogênio pode ser determinada pela incapacidade ou menor capacidade do tecido hepático em adquirir coloração pela ação do ácido periódico de Schiff (PAS). Em relação a este parâmetro, Ontell et al, em trabalho de isquemia e reperfusão hepáticas, realizado com circuito extracorpóreo e *in vitro*, observaram que fígados de ratos submetidos à isquemia apresentavam grandes áreas de depleção de glicogênio.⁷

Estudos do conteúdo de glicogênio em fígados humanos transplantados, realizados através de biópsias feitas em diferentes etapas do procedimento, demonstraram que durante a fase de reperfusão ocorria degradação do glicogênio hepático e que a incapacidade do fígado em restaurar essas reservas, estava associada à perda do enxerto em 85,7% dos casos.³¹ Nesses pacientes, avaliações do conteúdo de glicogênio em fragmentos de fígado obtidos uma semana após o transplante foram admitidas como úteis para definir a falência do enxerto e indicar a necessidade de retransplante.

Nos experimentos do Grupo Teste, a análise comparativa entre as médias dos valores do CGH, nos tempos correspondentes a T₁, T₂ e T₃, com a média dos valores desse parâmetro obtidos em T₀, demonstrou ter havido diminuições significativas dessas médias (Tabela 2). Diferentemente, nos experimentos do Grupo Controle, em qualquer dos tempos programados para estudo, não ocorreram alterações significativas desse parâmetro (Tabela 2).

No estudo intergrupo, ficou evidente a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os experimentos do Grupo Teste e os experimentos do Grupo Controle, no que concerne ao CGH, com verificação de significativas quedas deste parâmetro nos fígados dos animais do Grupo Teste durante os períodos de isquemia e reperfusão (Tabela 2). Nas condições de trabalho utilizadas, esses resultados permitem afirmar que tais diminuições foram devidas à isquemia e reperfusão hepáticas induzidas.

Em relação à CTPMN, quando se procedeu no Grupo Teste à análise comparativa entre cada uma das médias dos valores dessa contagem, obtidos nos tempos T₁, T₂ e T₃ e a média dos valores desse parâmetro obtidos em T₀, não foi verificada qualquer diferença estatisticamente significativa (Tabela 3), resultado diverso do constatado no Grupo Controle quando tal tipo de análise foi realizada (Tabela 3).

No estudo intergrupo não foram demonstradas diferenças significativas entre cada uma das médias dos valores de CTPMN, obtidos nos tempos programados nos cães do Grupo Teste e as médias dos valores desse parâmetro obtidos, em

tempos correspondentes, nos animais do Grupo Controle (Tabela 3).

Grupos celulares do tipo polimorfonucleares, entre eles os neutrófilos, têm sido considerados responsáveis, em grande parte, pela ocorrência de alterações patológicas que acompanham a lesão hepática de reperfusão.^{45,46,48-57} Os PMN, na reperfusão, infiltram o tecido hepático, notadamente o leito sinusoidal, e aí exercem suas ações. No nosso material esta infiltração ocorreu também em nível subcapsular, podendo ter concorrido para isto o próprio procedimento de retirada do fragmento de fígado.

Zimmerman e Granger, em trabalho de revisão de literatura, ressaltam não haver consenso sobre participação dos neutrófilos como causa ou efeito da lesão de reperfusão, embora exista tendência em se admitir que esta lesão parece ser mediada por metabólitos reativos de oxigênio e por PMN ativadas.⁵²

Sobre o assunto, seria ainda oportuno referir que resultados animadores têm sido obtidos com o uso de drogas, como a ciclosporina e o FK 506, para reduzir infiltração de neutrófilos em modelos experimentais de isquemia e reperfusão hepáticas.^{45,55}

No Grupo Teste, no estudo intragrupo, a expectativa com relação à contagem de PMN seria de aumento significativo destas células no evoluer dos experimentos, enquanto no Grupo Controle deveria ser esperado a inexistência de alterações significativas deste parâmetro no período de avaliação. É possível que diferenças significativas no Grupo Teste pudessem vir a ocorrer com o aumento do número de cães estudados e que as alterações significativas constatadas no Grupo Controle viessem a ser esclarecidas com análise de uma maior amostra de animais.

Ficou constatado que o modelo proposto, avaliado através da ocorrência de NH e depleção do glicogênio hepático, é adequado para realização de estudos sobre lesão de isquemia e reperfusão hepática.

Os resultados do presente estudo permitem concluir com uma confiança de 95% que:

1. Foram demonstrados aumentos progressivos de intensidade de NH e diminuições do CGH durante o período de isquemia e reperfusão do fígado;

2. Nestes períodos não foram comprovadas ocorrências de alterações significativas com relação a CTPMN no tecido hepático, entre os dois grupos experimentais investigados.

ABSTRACT

In the liver transplantation pathophysiology of hepatic ischaemia and reperfusion lesion is not completely understood. Several experimental models have been used to perform studies on tissue hypoxia and reperfusion of the liver. The present work, presents a modified model proposed to evaluate this kind of lesion. Twenty mongrel dogs, weighting 15.25 ± 1.21 kg, under general anesthesia, were referred to the following investigation groups: 1. Test Group (n = 10) - Animals were submitted to devascularization of 70 per cent of hepatic mass during a ninety minutes period, followed by liver reperfusion. During the time of ischaemia, splancnic venous decompression was provided through the right lateral and caudate lobes; 2. Control Group (n = 10) - The dogs were submitted to a sham operation. Liver samples were taken at 5 minutes before ischaemia (T_0), 5 minutes before reperfusion (T_1) and 1 hour (T_2) and 5 hours (T_3) after hepatic reperfusion. The method was evaluated by hepatic cells necrosis (HCN), hepatic glycogen content (HGC) and tissue polymorphonuclear cells counting (PMNCC). The results showed with a 95 per cent of confidence that: 1. There was a progressive rise in HCN intensity and a fall in HGC, during the hepatic ischaemia and reperfusion stages; 2. There was no evidence of significant differences in PMNCC between the investigated groups. The verified histologic change are expression of effective HCN derived from liver isquemia and reperfusion.

Key Words: Liver; Normothermic ischaemia; Reperfusion; Hepatic necrosis; Hepatic glycogen; Polymorphonuclear cells; Dogs.

REFERÊNCIAS

1. Aggarwal S, Kang Y, Freeman JA, et al - Post-reperfusion syndrome: cardiovascular collapse following hepatic reperfusion during liver transplantation. *Transplant Proc* 1987;19(4) suppl 3:54-55.
2. Aggarwal S, Kang Y, Freeman JA, et al - Post-reperfusion syndrome: hypotension after reperfusion of the transplanted liver. *J Crit Care* 1993;8(3):154.
3. Arll S, Monden K., Adachi Y, et al - Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. *Transplantation*, 1994;58(10):1072-1077.
4. Blanot S, Gillon MC, Lopes I, et al - Circulating endotoxins and postreperfusion syndrome during orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1995;60(1):103-106.
5. Fukuzawa K., Emre S, Senyuz O, et al - N-acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation*, 1995;59(1):6-9.
6. Kahn D, Hickman R, Dent DM, et al - For how long can the liver tolerate ischaemia? *Eur Surg Res* 1986;18:277-282.

7. Ontell SJ, Makowka L, Trager J, et al – Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann Surg* 1989; 209 (2): 200-210.
8. Peng XX, Currin RT, Thurman RG, et al – Protection by pentoxifylline against normothermic liver ischemia/reperfusion in rats. *Transplantation* 1995;59(11):1537-1541.
9. Piratvisuth T, Dunne JB, Williams R, et al – Amlodipine improves hepatic hemodynamic and metabolic function in the isolated perfused rat liver after sequential cold and warm ischemia. *Transplantation* 1995; 60(1):23-28.
10. Suehiro T, Boros P, Emre P, et al – Value of caval effluent in predicting early graft function after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(1/2):469-470.
11. Harris KA, Wallace C, Wall WJ – Tolerance of the liver to ischemia in the pig. *J Surg Res* 1982;33:524-530.
12. Hasselgren P – Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164:187-196.
13. Mays E Truman – Simpósio sobre cirurgia hepática: Oclusão vascular. *Clin Cir Am N* 1977;57(2):291-323.
14. Barbieri A, Zonta F, Saracino ML, et al – Evaluation of the reperfusion syndrome after liver ischemia in the rat. *J Surg Res* New York NY, 1996; 62(suppl. 2):153-158.
15. DeWeese MS, Lewis Jr. C, Mich AA – Partial hepatectomy in the dog: an experimental study. *Surgery* 1951;30(4):642-651.
16. Emond J, Wachs ME, Renz JF, et al – Total vascular exclusion for major hepatectomy in patients with abnormal liver parenchyma. *Arch Surg* 1995;130:824-831.
17. Furnival CM, Mackenzie RJ, Blumgart LH – The mechanism of impaired coagulation after partial hepatectomy in the dogs. *Surg Gynecol Obstet* 1976;143: 81-86.
18. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, et al – Liver ischemia for hepatic resection: Where is the limit? *Surgery* 1992;111:251-259.
19. Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, et al – Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. *Arch Surg* 1978;113:1448-1451.
20. Child III CG – The liver and Shock - cap. 9. In: *The hepatic circulation and portal hypertension*. Philadelphia PA, W.B. Saunders Company, 1954. p. 122-126.
21. Fonkalsrud EW – Common mechanisms of hypotension in irreversible shock and liver transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1969; 128(3): 601-602.
22. Rappaport AM, MacDonald MH, Borowy ZJ – Hepatic coma following ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1953;97:748-762.
23. Ito Y, Takahashi T, Sato K, et al – Effects of oxygenation during initial perfusion of the liver on hepatic metabolism and morphology following simple hypothermic storage in brain-dead rabbits. *Transplant Proc* 1997;29(1/2):359-361.
24. Kootstra G – The asystolic, or non-heartbeating donor. *Transplantation* 1997;63(7):917-921.
25. Kusano T, Shiraishi M, Miyaguni T, et al – Organ preserving effect of lidocaine administration in the model of orthotopic liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1996; 28(3):1928-1929.
26. Lindell SL, Southard JH, Vreugdenhil P, et al – Kupffer cells depress hepatocyte protein synthesis on cold storage of the rat liver. *Transplantation* 1994;58(8):869-874.
27. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al – Oxygen-derived free radicals in the hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1990;171:120-125.
28. Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, et al – The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;56(1): 24-31.
29. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al – Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors. Limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997;63(3):369-373.
30. Garcia-Valdecasas JC, Rull R, Grande L, et al – Prostacyclin, thromboxane, and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60(7):662-667.
31. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, et al – Ischemic injury in liver transplantation: Difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992;16(2):454-465.
32. Isai H, Nakajima Y, Kimura J, et al – Calcium mobilization in porcine orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(3):1.780-1.781.
33. Ishine N, Tanaka N, Yagi T, et al – Postreperfusion syndrome in swine liver transplantation: Comparison between orthotopic liver transplantation and total hepatectomy with portacaval shunt using aortic graft. *Transplant Proc* 1996;28(3):1.756-1.758.
34. Ishine N, Yagi T, Ishikawa T, et al – Hemodynamic analysis of post-reperfusion syndrome and the effect of preventing this syndrome using thromboxane A₂ synthetase inhibitor (OKY-046) in swine liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(1/2):378-381.
35. Jugan E, Albaladejo P, Jayais P, et al – The failure of venovenous bypass to prevent graft liver postreperfusion syndrome. *Transplantation* 1992; 54(1):81-84.
36. Kamachi H, Nakajima Y, Isai H, et al – Study of liver function in a graft suffering from warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(3):1.789-1.791.
37. Millis JM, Melinek J, Csete M, et al – Randomized controlled trial to evaluate flush and reperfusion techniques in liver transplantation. *Transplantation* 1997;63(3):397-403.
38. Oldhafer KJ, Schuttler W, Wiehe B, et al – Treatment of preservation/reperfusion liver injury by the protease inhibitor aprotinin after ischemia storage. *Transplant Proc* 1991;23(5):2.380-2.381.
39. Paulsen AW, Valek TR, Blessing WS, et al – Hemodynamics during liver transplantation with veno-venous bypass. *Transplant Proc* 1987; 19(1):2.417-2.419.
40. Pirenne J, Gunson B, Khaleef H et al – Influence of ischemia-reperfusion injury on rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29(1/2):366-367.
41. Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, et al – Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplant Proc* 1996; 28(3):1.908-1.909.
42. Wu G, Tomei D, Bathurst IC, et al – Antiapoptotic compound to enhance hypothermic liver preservation. *Transplantation* 1997;63(6): 803-809.
43. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, et al – Role of tumor necrosis factor - α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85:1.936-1.943.
44. Cursio R, Gugenheim J, Tovey M, et al – Protective properties of anti-IFN α /b Antibodies in normothermic hepatic ischaemia in the rat. *Transplant Proc* 1996;28(1):73-74.

45. Dhar DK, Nagasue N, Kimoto T, et al – The salutary effect of FK 506 in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. *Transplantation* 1992; 54(4):583-588.
46. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, et al – Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leuk Biol*, New York NY, 1995; 57:368-374.
47. Helling TS, Hacker KA, Kragel PJ, et al – Evidence for cytoprotection by prostaglandin E₁ with normothermic hepatic ischemia. *J Surg Res* 1994;56(4):309-313.
48. Swenson O, Grana L, Inouye T, et al – Immediate and long-term effects of acute hepatic ischemia. *Arch Surg* 1967;95:451-463.
49. Tomizawa N, Ohwada S, Ohya T, et al – Effects of neutrophil elastase inhibitor on reperfusion injury in the canine liver. *Transplant Proc* 1996;28(3):1767-1768.
50. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, et al – Leukocytes contribute to hepatic ischemia / reperfusion injury via intercellular adhesion molecule - 1 - mediated venular adherence. *Surgery* 1995;117(2):195-200.
51. Vollmar B, Glasz J, Post S, et al – Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury. *J Surg Res*, New York NY, 1996; 60(1):49-54.
52. Mor E, Tillery W, Solomon H, et al – The predictive value of hepatocyte glycogen content on liver allograft biopsy. *Transplantation* 1995; 59(1):141-143.
53. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, et al – Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264(4):G 801-809.
54. Jaeschke H, Schini VB, Farhood A – Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci* 1992; 50(23):1797-1804.
55. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al – Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 1993;55(6):1.265-1.272.
56. Toledo-Pereyra LH, Suzuki S – Neutrophils, cytokines, and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 1994;179(6):758-762.
57. Toledo-Pereyra LH, Suzuki S – Celular and biomolecular mechanisms of liver ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc* 1994;26(1): 325-327.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Edmundo Machado Ferraz
Rua Dom Sebastião Leme, 173/2.501
52011-160 – Recife-PE