

Taxa de mortalidade em ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol¹

Ernani Luís Rhoden²

Marcelo Mauri³

Cláudia Ramos Rhoden⁴

Márcio Luís Migliavacca Leal⁵

Marcelo Sabedotti⁵

Márcio Luís Lucas⁵

Luiz Pereira-Lima⁶

Rhoden EL, Mauri M, Rhoden CR, Leal MLM, Sabedotti M, Lucas ML, Pereira-Lima L. Taxa de mortalidade em ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol. Acta Cir Bras [serial online] 1999 Oct-Dec;14(4). Available from: URL: <http://www.scielo.br/acb>.

RESUMO: A isquemia transitória hepática tem sido cada vez mais amplamente utilizada. Contudo, essa atitude, embora muitas vezes benéfica, é contrabalançada pelos efeitos adversos advindos da isquemia hepática e da congestão esplênica, assim como, das conseqüências da reperfusão. O objetivo dos autores é determinar os efeitos da isquemia seletiva em animais pré-tratados ou não com alopurinol, inibidor da xantina oxidase sobre a mortalidade dos animais. Foram utilizados 30 ratos assim divididos: Grupo I (n=10): pré-tratados com alopurinol e submetidos à laparotomia e exposição do pedículo hepático por 45 minutos. Grupo II (n=10): tratados com alopurinol e submetidos à isquemia hepática seletiva por 45 minutos. Grupo III (n=10): submetidos apenas à isquemia por 45 minutos. A mortalidade pós-operatória foi avaliada a cada 24 horas, por um período de 10 dias. Entre os animais do grupo I, não foram observados óbitos, entretanto, naqueles dos grupos II e III, as mortalidades globais foram respectivamente 20 e 46,7%. Diferença estatisticamente significativa, apenas, entre a mortalidade observada no grupo III em relação ao controle ($p < 0,05$). A mortalidade pós-operatória no grupo de animais submetidos à isquemia sem pré-tratamento com alopurinol ascende as cifras de 46,67% dos animais, enquanto naqueles pré-tratados com alopurinol houve um importante decréscimo para 20%. Embora sem uma distinção estatisticamente significativa, reflete uma tendência de um efeito protetor do alopurinol na isquemia e reperfusão hepática.

DESCRIPTORIOS: Reperfusão. Alopurinol. Espécies de oxigênio reativas.

INTRODUÇÃO

A isquemia transitória hepática, muitas vezes requerida em procedimentos cirúrgicos sobre o fígado, seja para limitar as perdas sangüíneas ou quando a mesma se torna obrigatória, como é o caso dos transplantes, tem sido cada vez mais utilizada (1,2,3). Contudo, essa atitude, muitas vezes benéfica, é contrabalançada pelos efeitos adversos advindos da isquemia hepática e da congestão esplênica, assim como das conseqüências da reperfusão, significativamente deletéria, com sérias repercussões funcionais sobre o órgão (4,5,6).

O fenômeno isquêmico e reperfusional é, certamente, multifatorial e o envolvimento das espécies ativas do oxigênio (EAO) derivados do metabolismo anormal do oxigênio é um dos prováveis fatores determinantes da patogênese da injúria decorrente deste (7,8,9,10,11,12). Estudos distintos respaldam o mecanismo das EAO evidenciando efeitos benéficos de anti-oxidantes e, por outro lado, exacerbação do dano na deficiência destes, assim como o fato da lipoperoxidação ser evento bem caracterizado neste fenômeno oxidativo.

No que se refere à ação geradora de EAO pela enzima xantina oxidase, os resultados de diversos estudos experimentais têm sido controversos: trabalhos mostram efeitos benéficos de substâncias inibidoras da xantina oxidase sobre a função hepática e lipoperoxidação enquanto outros não demonstram efeitos significativos (13,14,15).

O alopurinol e seu metabólito principal, a aloxantina, são inibidores competitivos e não-competitivos, respectivamente, da enzima xantina oxidase, sendo esta inibição seu principal efeito farmacológico (13,14,17,18). A aloxantina possui uma permanência longa nos tecidos e é, indubitavelmente, responsável pela maior parte da atividade farmacológica da droga (14,19).

A principal ação proposta para os efeitos benéficos do alopurinol seria a de que inibindo a enzima xantina oxidase, que catalisa de modo irreversível a transformação da hipoxantina, proveniente do catabolismo de compostos energéticos de purina tais como o ATP, ADP, AMP, em xantina. Portanto, interrompendo essa rota de degradação, permitiria-se a ressíntese do ATP durante a fase de revascularização, restabelecendo assim, pelo menos em parte, o nível energético para a manutenção dos eventos metabólitos que se processam em nível celular e subcelular (20,21,22,23). Entretanto, os efeitos mais pronunciados residiriam, principalmente, na sua capacidade de inibir a geração de EAO no período reperfusional, tendo em vista ser a enzima xantina oxidase acceptora de elétrons e, portanto, capaz de formar o radical superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio (EAO) (14,16,22,24).

O objetivo dos autores é determinar os efeitos da isquemia transitória hepática normotérmica em ratos pré-tratados e não com alopurinol sobre a mortalidade destes animais.

MÉTODO

Animais

Para este estudo experimental randomizado foram utilizados 30 ratos Wistar machos, adultos, pesando entre 250 e 350 gramas, criados no Biotério da Disciplina de Farmacologia e Toxicologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Os animais foram mantidos em número de seis em gaiolas plásticas com dimensões de 47 X 34 X 18 cm, em sala com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e, ciclo claro de luz das 7 às 19 h, recebendo ração padronizada (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) e água "ad libitum".

Fármacos

#suspensão de alopurinol (Zyloric®, Glaxo Wellcome, 25mg/ml), preparada em solução fisiológica.

#solução anestésica composta (1:1) de cloridrato de xilazina (Kensol®, Körnig, Argentina, 20 mg/ml) : cloridrato de quetamina (Vetanorcol®, Körnig, Argentina, 50 mg/ml).

Procedimento experimental

Os animais foram divididos em três grupos de 10 animais cada:

#GRUPO I (CONTROLE): Neste grupo os animais receberam 50 mg/Kg de alopurinol, administrado por via intraperitoneal (i.p.) 5 e 1 hora antes da cirurgia. Após a anestesia com a referida solução na dose de 1 mg/kg, via i.p. e posterior laparotomia mediana com aproximadamente 4 cm de extensão, os animais permaneceram com o ventre aberto por um período de 45 minutos, ao final do qual efetuou-se o fechamento da cavidade abdominal com fio monofilamentar 3.0 (Mononylon, Ethicon) de forma contínua e em plano único. Além disso, os animais receberam 2 ml de soro fisiológico, para rehidratação, por via i.p., no final do procedimento.

#GRUPO II (ISQUEMIA E ALOPURINOL): Neste grupo de animais, além dos procedimentos descritos anteriormente (grupo I), efetuou-se a interrupção sangüínea seletiva dos lobos hepáticos médio e esquerdo por um período de tempo total de 45 minutos. Ao final deste intervalo de tempo, a pinça foi removida e a cavidade abdominal fechada, como já descrito. Além disso, foram administrados 2ml de soro por via i.p. para rehidratação.

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

Todos os animais foram acondicionados em gaiolas e observados durante um período de 10 dias, sendo a mortalidade pós-operatória avaliada a cada 24 horas. A variabilidade da mortalidade entre os grupos foi analisada pelo Teste Qui-Quadrado, considerando um alfa = 5%.

RESULTADOS

Entre os animais do Grupo I (Controle) não foram observados óbitos, entretanto, naqueles dos Grupos II e III as mortalidades globais foram respectivamente 20 e 46,7%, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa, apenas, entre a mortalidade observada no Grupo III em relação ao controle ($p < 0,05$). A maioria dos óbitos ocorreram nas primeiras 24 horas após o procedimento : 13,3 e 40% entre os grupos 2 e 3, respectivamente ($p > 0,05$) ([Tabela 1](#)).

Tabela 1 - Mortalidade pós-operatória de ratos controle e ratos submetidos a isquemia hepática tratados ou não com alopurinol

	24h	48h	72h	96h	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
	n%	n%	n%	n%	n%	n%	n%	n%	n%	n%
Grupo I : (Controle)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo II: (I + A)	2 (13.3)	1 (6.67)	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo III: (I)	6 (40)*	1 (6.67)	0	0	0	0	0	0	0	0
X ² (5%,39)	6,667	0,702	0	0	0	0	0	0	0	0

* Diferença estatisticamente significativa do grupo III quando comparado com o grupo I (p<0,05). Grupo I - Controle ;Grupo II - Isquemia hepática de 45 minutos e alopurinol pré-operatório; Grupo III - Isquemia hepática de 45 minutos.

Teste do Qui-Quadrado para um nível de significância de 95%.

DISCUSSÃO

A reperfusão sangüínea que se segue ao período isquêmico tem recebido cada vez mais atenção como fator potencial de dano ao órgão, pela possibilidade de gerar a formação de EAO, elementos radicais extremamente reativos com capacidade oxidativa e destrutiva das membranas fosfolipídicas celulares. Na realidade, tem sido proposto que o período reperfusional é tão ou mais deletério ao(s) órgão(s) submetido(s) a isquemia, do que esta propriamente (6).

Nas situações de isquemia e reperfusão, um dos mecanismo mais destacado como responsável pela geração de EAO tem sido relacionado à enzima xantina oxidase (8,12,21,24,25,26,27,28,29), e sobre a qual dirigimos a atenção no presente estudo.

O alopurinol, droga estudada no presente estudo, além da propriedade de inibir a enzima xantina oxidase, enzima considerada fundamental na geração do radical superóxido, apresenta a propriedade de agir como "scavenger" de EAO, assim como, a de permitir a ressíntese do ATP pela maior preservação da hipoxantina (22).

Na isquemia hepática completa em animais (ratos e cães) de laboratório, o tempo máximo tolerável é de 30 minutos, conforme demonstrado no estudo de Mackenzie (30), onde cães submetidos a uma interrupção completa do fluxo aferente sem derivação portal por períodos maiores de tempo levava a uma mortalidade universal dos animais decorrente do efeito lesivo da isquemia sobre o fígado e da congestão esplâncnica. Entretanto, a disposição anatômica do fígado de ratos em 5 lobos com pedículos individuais permite uma isquemia seletiva, removendo, assim, o fator congestão esplâncnica como elemento causador de óbitos.

A isquemia hepática leva a uma mobilização das reservas energéticas sob forma de trifosfato de adenosina (ATP) da unidade celular e eventos celulares que necessitam da ação ativa de determinadas bombas de íons, que sofrem alterações causando

uma variação da homeostase celular. Entre estas, observa-se o acúmulo desordenado de cálcio intracelular, o que leva à ativação de várias enzimas líticas e também a transformação da xantina dehidrogenase em sua forma ativa, a xantina oxidase. Esta última é capaz, no período reperfusional, de transformar de forma irreversível a hipoxantina em xantina, e além disso, como a referida enzima possui capacidade de ser aceptora de elétrons, transforma o oxigênio molecular (advindo da reperfusão) em radical superóxido, e, também, em outros radicais decorrentes (peróxido de hidrogênio e radical hidroxil), com potencial efeito lesivo hepatocitário. A lipoperoxidação, evento decorrente da ação das espécies radicais, leva a uma desestruturação celular e conseqüente morte celular adicional a aquela produzida pela isquemia.

O pré-tratamento de animais com alopurinol, substância inibidora da enzima xantina oxidase, poderia interferir na geração das espécies radicais e conseqüentemente reduzir a peroxidação dos componentes lipídicos das membranas celulares, reduzindo o dano decorrente da reperfusão de órgãos previamente isquêmicos.

O reflexo desses fenômenos sobre a mortalidade dos animais observados no presente estudo ocorreram predominantemente nas primeiras 48 horas após o procedimento, provavelmente decorrente de uma ação aguda decorrente do dano induzido sobre o fígado.

Embora não se tenha observado uma distinção estatisticamente significativa entre os animais pré-tratados, e não, com alopurinol, as taxas de mortalidade globais de 20 e 46,7%, respectivamente, indicam pelo menos uma tendência para uma maior ocorrência do evento naqueles ratos não submetidos ao pré-tratamento com a referida substância. Ou seja, uma tendência de efeito protetor do alopurinol sobre o dano decorrente da isquemia normotérmica transitória hepática.

CONCLUSÃO

A enzima xantina oxidase parece exercer uma significativa atividade no tecido hepático e a inibição de sua ação em situações de isquemia transitórias do fígado pode se traduzir por significativos efeitos benéficos.

REFERÊNCIAS

1. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of kupffer cells in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 1995; 109:189-97. [[Links](#)]
2. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harad A, Makao A, Takagi OH. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J. Surg Res* 1995; 59:772-9. [[Links](#)]
3. Xia ZF, Horton JW, Zhao PY, Babcock EE, Sherry D, Malloy CR. Effects of ischemia on intracellular sodium and phosphates "in vivo" rat liver. *J AppI Physiol* 1996; 81(3):1395-403. [[Links](#)]

4. Huguet C, Nordlinger B, Galopin JJ, Bloch P, Gallot D. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 147:689-94. [[Links](#)]
5. Suc B, Panis Y, Belghiti J, Fékété F. Natural history of hepatectomy. *Br J Surg* 1992; 79:39-42. [[Links](#)]
6. Isozaki H, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 1992; 79:310-3. [[Links](#)]
7. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983; 94(3):415-22. [[Links](#)]
8. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames B, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Inter Med* 1987; 107(4):526-45. [[Links](#)]
9. Defreigne JO, Pincemail J, Detry O, Franssen C, Meurisse M, Limet R. Variations of glutathione and vitamin E concentrations after hypothermic storage in Euro-collins solution and reperfusion of the rabbit kidney. *Transplant Proc* 1995; 27(5): 2783-5. [[Links](#)]
10. Descotes JL, Payen E, Chapelier E, Rambeaud JJ, Ferrari M, Mazuer J, Odin J. Cold and renal warm ischemia and postoperative survival in rabbits with autotransplanted kidneys. *Transplant Proc* 1995; 27(5):2874-6. [[Links](#)]
11. Menger MD. Microcirculatory disturbance secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 1995; 27(5):2863-5. [[Links](#)]
12. Chavez-Cartaya R, Desola GP, Ramirez-Romero P, Calne SRY, Jamieson NV. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J Surg Res* 1996; 60:199-206. [[Links](#)]
13. Rhoden EL, Mauri M, Petteffi LL, Dacanal F, Pilla M, Bello-Klein A, Telöken C, Barros E, Rhoden CR. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 1998; 13(2):73-9. [[Links](#)]
14. Zager RA, Gmur DJ. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. *Acta J Physiol* 1989; 257:953-8. [[Links](#)]
15. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. Postischemic renal dysfunction: the limited role of xanthine oxidase-generated oxygen free radicals. *J Surg Res* 1990; 49:488-92. [[Links](#)]
16. Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O₂ in peroxypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; 263:251-5. [[Links](#)]
17. Elion GB. Allopurinol and other inhibitors of urate. In: Elion GB. *Uric acid*. Berlin: Springer-Verlag; 1978. p.485-514. [[Links](#)]

18. Hansson R, Gustafsson B, Jonsson O, Lundstan S, Petterson S, Schersten T, Waldenström J. Effect of xanthine oxidase inhibition on renal circulation after ischemia. *Transplant Proc* 1982; 14(1):51-8. [[Links](#)]
19. Insel PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE. *The pharmacological basis of therapeutics*. 9ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 617~58. [[Links](#)]
20. Cunningham SK, Keaveny TV, Fitzgerald P. Effect of allopurinol on tissue ATP, ADP and AMP concentrations in renal ischemia. *Br J Surg* 1974; 61:562-5. [[Links](#)]
21. Paller MS, Hoidal JR, Ferris T. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74:1156-64. [[Links](#)]
22. Karwinski W, Ulvik R, Farstad M, Svardal A, Berge R, Soreide O. Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *Eur J Surg* 1993; 159: 355-9. [[Links](#)]
23. Di Lisa F, Silverman HS, Hansford RG. Mitochondrial function and cell injury in single cardiac myocytes exposed to anoxia and reoxygenation *Transplant Proc* 1995; 27(5):2829-30. [[Links](#)]
24. Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 1983; 314(26):1670-6. [[Links](#)]
25. Cohen PJ. Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can J Anaesth* 1992; 39:1090-3. [[Links](#)]
26. Takemoto Y, Uchida M, Nagasue N, Ohiwa K, Kimoto T, Dhar DK, Nakamura T. Changes in calcium content of the liver during hepatic ischemia-reperfusion in dogs. *J Hepatol* 1994; 21:743-7. [[Links](#)]
27. Nicolli A, Costantini P, Basso E, Colonna R, Petronilli V, Bernardi P. Potential role of cyclosporin A-sensitive mitochondrial channels in ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1995; 27(5):2825-6. [[Links](#)]
28. Willet K, Vaz de Macedo D, Detry O, Evens A, Pereira da Silva L, Sluse FE. Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and "in vivo". *Transplant Proc* 1995; 27(5): 2827-8. [[Links](#)]
29. Bach F, Singer D, Schiedl A, Bauer M, Larsen R. High energy phosphates and direct calorimetry as predictive parameters for metabolic recovery of the rat liver following ischemia. *Acta Anesthesiol Scand* 1996; 40:940-7. [[Links](#)]
30. Mackenzie RJ, Furnival CM, O'keane MA, Blumgart LH. The effects of prolonged hepatic ischaemia before 70 per cent partial hepatectomy in the dog. *Br J Surg* 1977; 64:66-9. [[Links](#)]

Rhoden EL, Mauri M, Rhoden CR, Leal MLM, Sabedotti M, Lucas ML, Pereira-Lima L. Mortality rates in rats submitted to hepatic ischemia-reperfusion, treated or not with allopurinol. Acta Cir Bras [serial online] 1999 Oct-Dec;14(4). Available from: URL: <http://www.scielo.br/acb>.

SUMMARY: The transitory hepatic ischemia has been frequently used. However, this procedure, benefic some times, is contrabalanced by the adverse effects from the hepatic ischemia and esplenic congestion, as well as of the reperfusion consequences. The objective of the authors is to determine the effects of the selective ischemia in pretreated and not pretreated rats with allopurinol, inhibitor of the xantine oxidase enzyme, in the mortality of the rats. Thirthy Wistar rats were used and divided into three groups: Group I (n=10): pretreated with allopurinol and submitted to laparotomy and exposition of the hepatic vessels for 45 min. Group II (n=10): pretreated with allopurinol and submitted to selective hepatic ischemia for 45 minutes. Group III (n=10): Submitted only to selective hepatic ischemia for 45 min. The postoperative mortality was evaluated each 24 hours, by one period of 10 days. Among the animals of the group 1, it wasn't observed deaths, however, in those of the groups II and III, the global rates of mortality were, respectively, 20 and 46.67%. Statistically significative difference , was bettween the observed mortality in groups I and III ($p < 0.05$). The postoperative mortality in the group of animals submitted to ischemia without pretreatment with allopurinol was 46.67%, while in those animals pretreated with allopurinol, there was an important decrease to 20%. Even without an statistically significative distinction, it reflects a tendency of a protector effect of the allopurinol in the hepatic ischemia and reperfusion.

SUBJECT HEADINGS: Reperfusion. Allopurinol. Reactive oxygen species.

Endereço para correspondência:

Ernani Luís Rhoden
Av. Alberto Bins, 456/73
90030-140 Porto Alegre-RS

Data do recebimento: 30/04/99

Data da revisão: 01/06/99

Data da aprovação: 03/07/99

¹. Trabalho realizado nos Departamentos de Farmacologia e Cirurgia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

². Urologista/Cirurgião Geral. Mestre em Clínica Cirúrgica pela FFFCMPA.

³. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

⁴. Professora Adjunta da Disciplina de Farmacologia e Toxicologia da FFFCMPA.

⁵. Monitores da Disciplina de Farmacologia e Toxicologia da FFFCMPA.

⁶. Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Geral da FFFCMPA.