

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DOS EFEITOS DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICA EM RATOS

BIOCHEMICAL ASSESSMENT OF ISCHEMIC PRECONDITIONING AFTER HEPATIC ISCHEMIA AND REPERFUSION IN RATS

Fábio Neves da Silva, TCBC-RJ¹; Ricardo Antonio Refinetti, TCBC-RJ²; José Marcus Raso Eulálio, TCBC-RJ³

RESUMO: *Objetivo:* Comparar a lesão hepatocelular ocasionada pelo emprego do pré-condicionamento isquêmico e de duas outras modalidades de clameamento triade portal: clameamento contínuo e intermitente. *Método:* Quarenta ratos Wistar foram divididos em quatro grupos de 10 animais cada. No Grupo Sham nenhuma espécie de clameamento foi adotada. Nos outros três, provocamos isquemia de quarenta minutos por meio do clameamento do pedículo hepático. No Grupo I esta isquemia foi contínua. No Grupo II, também contínua, mas precedida de cinco minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento isquêmico). No Grupo III foi realizada isquemia intermitente em ciclos de 10 min de isquemia e cinco minutos de reperfusão. Para avaliar a lesão hepatocelular foi adotada a dosagem de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), glutâmico pirúvico (TGP) e lactato desidrogenase (LDH), aferidas no início e no final dos procedimentos. *Resultados:* Não houve diferença estatística nos valores basais das enzimas estudadas, demonstrando uniformidade nos grupos. Os quatro grupos apresentaram variação significativa de todas as enzimas entre os dois momentos de coleta, porém de forma diferenciada. A variação no Grupo Sham foi menor que a do grupo II. Este foi semelhante ao grupo III e em todos a elevação foi significativamente menor que no grupo I (D do Sham < D do Grupo II = D Grupo III < D Grupo I). *Conclusão:* Em ratos Wistar o clameamento contínuo do pedículo hepático, precedido de um ciclo de cinco minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento isquêmico) provoca menor lesão hepática do que o clameamento contínuo e apresenta resultados comparáveis aos obtidos através da utilização do clameamento intermitente, em fígados normais submetidos a um período de isquemia hepática de 40 minutos e um tempo total de cirurgia de 60 minutos (Rev. Col. Bras. Cir. 2006; 33(6): 393-397).

Descritores: Fígado; Isquemia; Reperfusão; Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

Quando o fluxo sanguíneo aferente ao fígado é interrompido, objetivando menor perda sanguínea durante a secção do parênquima hepático, devemos lembrar que o tecido remanescente está sendo privado do aporte de oxigênio o que acarretará graus variáveis de lesão celular. Tanto o sangramento excessivo quanto a isquemia celular interferem diretamente na morbidade e mortalidade operatórias.

Diversas substâncias liberadas durante o processo de isquemia/reperfusão têm sido identificadas e seu papel no dano celular, estudados¹⁻⁶. Frente a este fato, seguiram-se os trabalhos com a intenção de avaliar a interferência na liberação destas substâncias no tecido hepático^{4,7-11}.

Este experimento reproduz situações de isquemia hepática com o objetivo de avaliar e comparar o dano celular hepático, por meio da dosagem enzimática, com a utilização do pré-condicionamento isquêmico com outras duas modalidades de clameamento da triade portal: clameamento contínuo e intermitente.

MÉTODO

Foram utilizados 40 ratos Wistar, pesando entre 280 e 370 gramas provenientes do Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da U.F.R.J. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais de Laboratório - CEPAL-UFRJ. Todos os animais foram mantidos em condições idênticas de alimentação e água, oferecidos, sem restrição, no período pré-operatório. Foram submetidos ao jejum de 12 horas, sendo aleatória a escolha do animal na composição dos grupos. A indução da anestesia foi obtida com éter em câmara fechada onde o animal era alocado. Após a perda da consciência era transferido para a mesa cirúrgica e fixado. Realizava-se tricotomia abdominal ampla e anti-sepsia com polivinilpirrolidona iodo. Era administrado, a seguir, por via intraperitoneal 10 mg/kg de cetamina e 60 mg/kg de xilazina. Aguardava-se aproximadamente 5 minutos para a ação das drogas para então iniciar a operação. O acesso à cavidade abdominal foi obtido por meio de incisão mediana, partindo do apêndice xifóide e estendendo-se 5 cm no sentido caudal.

1. Mestre e Doutor em Cirurgia pela Faculdade de Medicina da UFRJ.

2. Professor Titular do Departamento de Cirurgia Faculdade de Medicina da UFRJ.

3. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ.

Recebido em 20/06/06

Aceito para publicação em 25/07/06

Conflito de interesses: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Parte da Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ. como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Doutorado.

As amostras de sangue foram colhidas, por cateterismo da veia cava inferior infra-hepática com extracath número 22, no início e ao final de 60 minutos de procedimento operatório. Estas amostras eram acondicionadas, centrifugadas e analisadas no mesmo dia para dosagem de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e lactato desidrogenase (LDH).

Os quarenta animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais cada de acordo com o procedimento utilizado (Figura 1). No Grupo *Sham* nenhuma espécie de clameamento foi adotada. Nos outros três, provocamos isquemia de quarenta minutos por meio do clameamento do pedículo hepático. No Grupo I esta isquemia foi contínua. No Grupo II, também contínua, mas precedida de 5 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento isquêmico). No Grupo III foi realizada isquemia intermitente em ciclos de 10 min de isquemia e 5 min de reperfusão.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelas técnicas de análise variância *one way* (TGO, TGP), ANOVA de Kuskal-Wallis (LDH), teste *t* de Student emparelhado, teste de postos sinalizados de Wilcoxon e teste de variações múltiplas, dependendo do objetivo ou enzima a ser avaliada (a). Foi definido como significativo um *p valor* < 0,05.

RESULTADOS

Os valores obtidos pela dosagem das três enzimas estudadas em cada animal, isoladamente, estão listados na Tabela 1. Os quatro grupos foram considerados comparáveis por apresentar o mesmo sexo, peso semelhante, por terem sido submetidos às mesmas condições pré-operatórias e anestésicas e por terem sido submetidos ao mesmo tempo operatório.

Análise Estatística

Houve diferença significativa nas variações absolutas de TGO (*p*=0,0001), TGP (*p*=0,0001) e LDH (*p*=0,0001) entre os grupos, mas de forma diferenciada (Figuras 2,3,4). A variação média da TGO do grupo Sham foi significativamente menor que dos grupos GI, GII e GIII; e no grupo GI foi significativamente maior que nos grupos GII e GIII, ao nível de 5%. Não houve diferença significativa entre os grupos GII e GIII.

Os grupos apresentaram, portanto, um aumento enzimático estatisticamente significativo do início para o final da cirurgia, porém de forma diferenciada, ou seja:

$$D \text{ do Sham} < D \text{ do Grupo II} = D \text{ Grupo III} < D \text{ Grupo I}$$

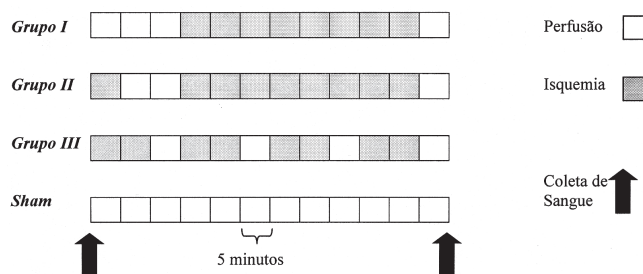


Figura 1 - Divisão dos grupos de acordo com a operação proposta.

DISCUSSÃO

A interrupção, por um curto período, do fluxo sanguíneo aferente ao fígado, seguido de reperfusão por um tempo variável, protege o órgão de um segundo, e mais prolongado, clameamento. Tentou-se neste trabalho, então, reproduzir os mesmos bons resultados do PI em fígados de ratos normais submetidos a um período prolongado de isquemia.

Além das enzimas estudadas, outras substâncias, bem como as alterações histológicas e celulares têm sido utilizadas para quantificar o grau de lesão hepática, como a atividade inflamatória, índice de apoptose, ativação de células de Kupffer, interação leucócito-endotelial e o estado redox mitocondrial¹²⁻¹⁴. Também destacam-se estudos com os níveis de xantina e o grau de conversão de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase^{4,15}, produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), a expressão de RNAm^{5,16,17} ou a geração de radicais livres¹⁰. Enfim, uma série de substâncias, sejam elas intracelulares, mediadores inflamatórios, assim como alterações microcirculatórias, histológicas ou celulares podem ser empregadas com segurança neste tipo de avaliação¹⁸.

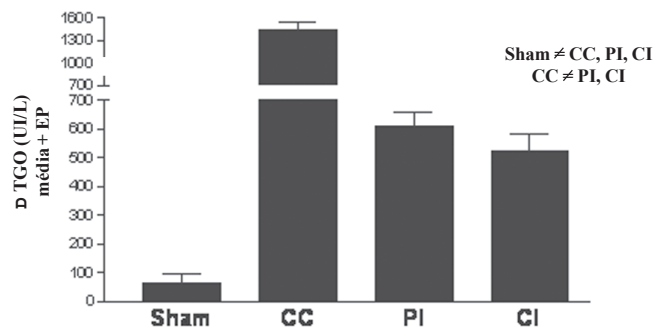


Figura 2 - Variação absoluta do TGO segundo o grupo.

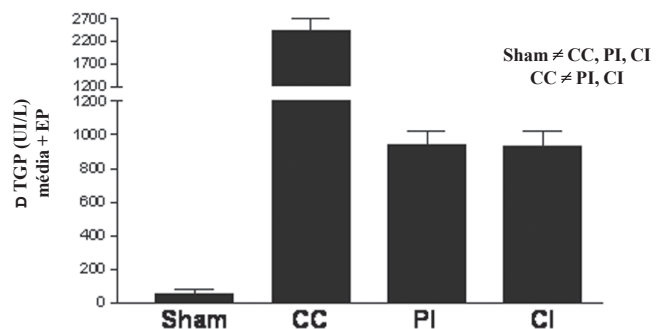


Figura 3 - Variação absoluta do TGP segundo o grupo.

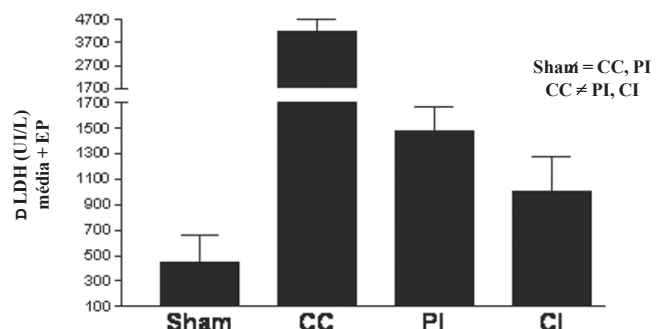


Figura 4 - Variação absoluta da LDH segundo o grupo.

Tabela 1 - Resultado das dosagens enzimáticas em toda a amostra (UI/L).

Grupos	Animais	TGO		TGP		LDH	
		Início	Final	Início	Final	Início	Final
Grupo Sham	1	195	227	74	94	2432	4840
	2	256	310	76	344	3095	3187
	3	354	400	247	305	1593	1954
	4	285	320	70	92	1441	1820
	5	274	300	138	153	2320	2540
	6	700	815	380	415	1860	2135
	7	320	630	95	110	1580	1705
	8	230	195	160	254	1742	2028
	9	340	370	215	205	2023	2210
	10	253	285	83	148	2358	2490
Grupo I (CC)	1	300	2130	100	3980	3660	6660
	2	460	1900	304	1960	5385	7995
	3	282	1280	71	1890	4080	6020
	4	253	1350	99	1725	1785	5480
	5	460	1730	250	2064	1635	7950
	6	215	1380	125	3432	1890	5815
	7	360	2200	146	1914	2064	8945
	8	235	1820	178	2546	3210	9028
	9	260	1500	240	3685	2280	6645
	10	195	2080	86	2671	2030	5304
Grupo II (PI)	1	245	780	94	845	2345	3875
	2	324	1054	156	1032	1750	2987
	3	286	958	142	946	3128	4685
	4	278	845	127	1430	1895	3054
	5	366	935	230	1105	1640	2648
	6	402	1204	309	1824	3834	5684
	7	298	598	89	739	2405	4285
	8	350	890	176	1083	1687	3258
	9	434	1234	208	995	2654	3068
	10	258	827	74	968	1986	4569
Grupo III (CI)	1	438	1042	216	950	3900	3890
	2	278	850	85	833	4020	3500
	3	244	1127	75	910	3390	4188
	4	147	807	35	940	2625	4818
	5	269	690	125	1023	1550	2554
	6	310	575	205	1650	1865	2845
	7	220	550	98	755	2085	3400
	8	245	735	160	964	2604	4030
	9	270	815	183	1048	2320	3145
	10	315	780	324	1790	3115	5200

Foi selecionada neste estudo a concentração sérica das transaminases glutâmico oxalacética (TGO) e glutâmico-pirúvica (TGP), assim como da lactato desidrogenase (LDH) como parâmetro de lesão celular. Apesar de existirem muitas opções entre as substâncias utilizadas para qualificar e quantificar a lesão isquêmica do hepatócito, optou-se pela dosagem de TGO, TGP e LDH pela facilidade de execução e pela grande frequência com que são utilizadas sejam isoladamente ou acompanhadas de outros métodos de avaliação ^{2,5-}

^{7,11,14,16,17,19-23}. Além disso, são efetivamente as mais utilizadas na prática clínica para o acompanhamento dos pacientes.

Para que não houvesse interferência do tempo operatório e anestésico nos resultados, manteve-se nos quatro grupos o mesmo tempo operatório (60 minutos) e nos três submetidos a clampeamentos, o mesmo tempo de isquemia (40 minutos).

Como resultado deste experimento, obteve-se elevação média das três enzimas estudadas em todos os quatro

grupos entre o início e o final da operação. As variações da TGO no grupo Sham não foram significativas ($p=0,057$). No entanto, o mesmo não aconteceu com as alterações da TGP e LDH neste grupo que apresentaram um p valor de 0,046 e 0,002 respectivamente. Acreditamos que estas alterações significativas possam decorrer da resposta ao trauma cirúrgico/anestésico, combinado à diminuição da volemia pela coleta de sangue, mas não houve estudo específico a este respeito. Nos demais grupos houve alteração bastante significativa ($p=0,0001$) nos níveis de TGO e TGP. As variações da LDH, apesar de estatisticamente significativas não foram tão intensas quanto das outras duas enzimas.

Quando comparados os quatro grupos entre si, observou-se diferença significativa nas variações absolutas das três enzimas entre eles ($p=0,0001$). Desta forma, pode-se notar que todos os grupos apresentaram elevação significativa nos níveis séricos das enzimas estudadas do início para o final da cirurgia, porém de forma diferenciada. A variação no grupo Sham foi menor que a do grupo II, que foi semelhante ao do grupo III que foi menor do que a do grupo I (Δ do Sham $<$ Δ do Grupo II = Δ Grupo III $<$ Δ Grupo I). A análise destes dados nos permitiu verificar que tanto o clampeamento intermitente quanto o pré-condicionamento isquêmico provocam mais lesão hepática que o grupo Sham, porém em menor intensidade que no grupo de isquemia contínua. Não houve vantagem estatística na utilização de um ou outro método de proteção tecidual hepática. Parece-nos, entretanto, que o emprego do PI traria vantagens à adoção do CI por evitar as frequentes interrupções no procedimento cirúrgico, necessárias neste último.

A função citoprotetora do pré-condicionamento isquêmico (PI) verificada no estudo vem ao encontro de resultados semelhantes encontrados nas recentes publicações científicas. Vale destacar os benefícios de uma isquemia de 5 minutos precedendo outros 30 minutos sem perfusão hepática, quando comparados a um grupo isquêmico para controle¹². Trabalhos recentes demonstraram vantagens do PI em fígados transplantados^{3,17}, confirmando o experimento de Fernandez, em Barcelona¹⁵. Assim como no nosso estudo, Rudiger¹⁴ comparou os resultados do PI com os obtidos pelo CI. Apresentou uma conclusão interessante. Tanto o pré-condicionamento isquêmico quanto o clampeamento intermitente são efetivos na proteção hepatocelular em períodos de isquemia prolongada. O

PI foi superior ao CI em períodos de até 75 minutos por não estar associado à perda sanguínea durante a transecção hepática. Entretanto, para períodos mais prolongados (acima de 75 minutos) o CI mostrou-se superior. Iwasaki², em trabalho experimental, mostrou a somatória dos benefícios do pré-condicionamento isquêmico em relação ao clampeamento intermitente. Dividiu seus animais em 5 grupos: grupo sham, isquemia contínua com ou sem PI e isquemia contínua com ou sem PI. Concluiu que o PI exerce um maior efeito protetor quando a isquemia hepática é intermitente. Glanemann¹³, também comprova o benefício citoprotetor do PI e sugere que um dos possíveis mecanismos envolvidos, os quais ainda não estão completamente compreendidos, seja a preservação do estado redox das mitocôndrias, garantido pela prevenção da ativação das células de Kupffer e da falência de perfusão sinusoidal. Outro possível mecanismo envolvido foi descrito por Teoh⁶ em 2002. Trata-se da ativação de substâncias associadas à entrada dos hepatócitos no ciclo celular, um efeito biológico crítico que favorece a sobrevivência do fígado contra a injúria de isquemia/reperfusão. O metabolismo das xantinas, o fator de necrose tumoral alfa, a regulação microcirculatória entre outros também têm sido envolvidos nos bons resultados do PI^{3, 5, 15, 17}.

Vários trabalhos, no entanto, que compararam diversas modalidades de clampeamento, mesmo que com a utilização de intervalos de isquemia e reperfusão diferentes ou de animais doentes ou saudáveis, chegaram às mesmas conclusões: há benefício da utilização do clampeamento intermitente e do pré-condicionamento isquêmico, especialmente em situações de necessidade de isquemia prolongada. A opção entre os métodos dependerá da resposta hemodinâmica do paciente a um período maior de isquemia hepática contínua comparada ao maior tempo operatório proporcionado pela isquemia intermitente.

Os dados encontrados em nossa experimentação nos permitiram concluir que em ratos de *Wistar* o clampeamento contínuo do pedículo hepático, precedido de um ciclo de 5 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento isquêmico) provoca menor lesão hepática do que o clampeamento contínuo e apresenta resultados comparáveis aos obtidos através da utilização do clampeamento intermitente, em fígados normais submetidos a um período de isquemia hepática de 40 minutos e um tempo total de cirurgia de 60 minutos.

ABSTRACT

Background: To compare the hepatocyte injury due to the employment of previous ischemic conditioning and two other commonly used maneuvers for clamping the portal triad: continuous clamping and intermittent clamping. **Methods:** 40 Wistar rats were divided in 4 groups. On the SHAM group, no clamping was performed. On the other 3 groups, a 40 minutes ischemia was induced by clamping the portal triad. On the Group I we performed a continuous ischemia. On the Group II, before the continuous clamping, a 5 minutes ischemia and a 10 minutes reperfusion was performed (i.e. previous ischemic conditioning). On Group III an intermittent clamping was performed in a 10 minutes ischemia and 5 minutes reperfusion cycle. In order to assess the hepatocyte injury, the Oxalacetic transaminase (SGOT), the pyruvic transaminase (SGPT), as well the lactic desidrogenase (LDH) were titled before and after the procedures. **Results:** There was no difference between the values of the starting samples on all the groups, revealing the uniformity of them. The four groups presented significant differences in the starting and ending samples. The odds of SHAM group were lesser significant then in the Group II, that was similar to the group III and in all the groups the rising was significant lower then the Group I (Δ SHAM $<$ Δ Group II = Δ Group III $<$ Δ Group I). **Conclusions:** On Wistar rats, the continuous clamping after the previous ischemic conditioning, induced a minor hepatocyte injury in comparison to the continuous clamping alone and is similar to the intermittent clamping in normal livers, submitted to 40 minutes of hepatic clamping in a whole 60 minutes procedure.

Key-words: Liver; Ischemia; Reperfusion; Rats, Wistar.

REFERÊNCIAS

1. Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl.* 2002;8(11):990-9.
 2. Iwasaki Y, Tagaya N, Hattori Y, Yamaguchi K, Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against intermittent warm-ischemia-induced liver injury. *J Surg Res.* 2002;107(1):82-92.
 3. Jiang Y, Gu XP, Qiu YD, Sun XM, Chen LL, Zhang LH, Ding YT. Ischemic preconditioning decreases C-X-C chemokine expression and neutrophil accumulation early after liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol.* 2003;9(9):2025-9.
 4. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation.* 2002;73(8):1203-11.
 5. Shinoda M, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kitajima M. Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(11):1211-9.
 6. Teoh N, Dela Pena A, Farell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology.* 2002;36(1):94-102.
 7. 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.
 8. Liang J, Yamaguchi Y, Matsumura F, Goto M, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Ohshiro H, Ishihara K, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Calcium-channel blocker attenuates Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Dig Dis Sci.* 2000;45(1):201-9.
 9. Oliveira CP, Lopasso FP, Laurindo FR, Leitão RM, Laudanna AA. Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil. *Transplant Proc.* 2001;33(6):3010-4.
 10. Uchinami M, Muraoka R, Horiuchi T, Tabo T, Kimura N, Naito Y, Yoshikawa T. Effect of intermittent hepatic pedicle clamping on free radical generation in the rat liver. *Surgery.* 1998;124(1):49-56.
 11. WANG M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, Dohno K, Nakamori S, Monden M. Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain mu activation. *J Hepatol.* 2001;34(2):278-83.
 12. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R, Munchow S, Dikopoulos N, Lippek F, Langrehr JM, Dietel M, Neuhaus P, Nussler AK. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/reperfusion injury. *Surgery.* 2004;135(2):203-14.
 13. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol.* 2003;38(1):59-66.
 14. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg.* 2002;235(3):400-7.
 15. Nilsson B, Friman S, Gustafsson BI, Delbro DS. Preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver. *J Gastrointest Surg.* 2000; 4(1):44-9.
 16. 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.
 17. Zhang SJ, Zhu CJ, Zhao YF, Li J, Guo WZ. Different ischemic preconditioning for rat liver graft: protection and mechanism. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int.* 2003;2(4):509-12.
 18. Sherlock S, Dooley J. Assessment of liver function. In: Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system.* 10th ed. Oxford: Blackwell Science; 1997. p.17-32.
 19. Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Vezzoni A, Pozzi S, Andreoni B. Comparison of continuous versus intermittent hepatic pedicle clamping in an experimental model. *Hepato-gastroenterology.* 2001;48(41):1416-20.
 20. Silva FN. Isquemia hepática normotérmica: redução da lesão celular através do uso de clampeamento pedicular intermitente – estudo experimental em ratos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
 21. Lei DX, Peng CH, Peng SY, Jiang XC, Wu YL, Shen HW. Safe upper limit of intermittent hepatic inflow occlusion for liver resection in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol.* 2001;7(5):713-7.
 22. Erdogan O, Yildiz S, Basaran A, Demirbas A, Yesilkaya A. Effect of verapamil infusion on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Pol J Pharmacol.* 2001;53(2):137-41.
 23. Zhang Y, Zhang B, Pan R. Protective effect of ischemic preconditioning on liver. *Chin J Traumatol.* 2001;4(2):123-5.
- Como citar este artigo:
Silva FN, Refinetti RA, Eulálio JRM. Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão hepática em ratos. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2006 Nov-Dez; 33(6). Disponível em URL: www.scielo.br/rcbc
- Endereço para correspondência:
Fábio Neves da Silva
Av. Ataulfo de Paiva, 1460/801
Leblon
22240-031- Rio de Janeiro – RJ
E-mail: fabioneves@ig.com.br