

Laboratorio de Cirugía Experimental.
Universidad del País Vasco.
Servicio de Cirugía General «B».
Hospital de Basurto.

Efecto de terapéuticas antioxidantes en la regeneración del hígado isquémico

Portugal, V.; García-Alonso, I.; Bilbao, J.; Barceló, P. y Méndez, J.

SUMMARY

Ischemia is a common situation, not always desirable, in liver surgery. In any case, it implies cellular damage that would be worth avoiding. In the present study, different antioxidant drugs (superoxide-dismutase, allopurinol and folic acid) are administered prior to liver reperfusion in order to reduce ischemic damage. Liver regeneration, following a 70% hepatectomy and 15 minutes of normothermic hepatic ischemia, serves as an indirect functional test of the reperfused liver. SOD (6 mg/kg) and allopurinol (50 mg/kg) have accelerated hepatocytic DNA synthesis without increasing the number or percentage of activated hepatocytes. However, the folic acid has proved to be very effective, counteracting the deleterious effect of liver ischemia on hepatocytic regeneration.

KEY WORDS: Liver regeneration, liver, ischemia, antioxidants, folic acid.

Portugal, V.; García-Alonso, I.; Bilbao, J.; Barceló, P. y Méndez, J. Antioxidant therapies and ischemic liver regeneration. Rev Esp Enf Digest. 1993. 83. 434-438.

RESUMEN

La isquemia es una situación común en la cirugía hepática: unas veces como maniobra buscada, otras como situación inevitable. En cualquier caso, supone una agresión tisular cuyas consecuencias sería deseable limitar. En este estudio, se intenta disminuir el daño producido al hígado por la isquemia, mediante diferentes antioxidantes (superóxido-dismutasa, alopurinol, ácido fólico) administrados antes de reperfundir el órgano. Sobre un modelo de isquemia hepática normotérmica de quince minutos de duración, se valora la actividad regenerativa tras hepatectomía parcial: utilizando este parámetro como un indicador indirecto de la capacidad funcional del hígado. La administración de SOD (6 mg./kg.) o alopurinol (50 mg/kg) sólo ha logrado acelerar la síntesis hepatocitaria de DNA, pero sin aumentar el porcentaje de hepatocitos que se activan. En cambio, el tratamiento con ácido fólico se ha mostrado muy efectivo, revertiendo por completo el efecto deletéreo que la isquemia tiene sobre la regeneración hepatocitaria.

PALABRAS CLAVE: Regeneración hepática, hígado, isquemia, antioxidantes, ácido fólico.

INTRODUCCION

La isquemia hepática es un fenómeno de gran trascendencia quirúrgica, utilizándose en diferentes técnicas dentro de la cirugía hepática: resecciones parciales (metastasectomías) y reparación de traumatismos hepáticos (1). Asimismo, durante todo trasplante hepático tienen lugar un periodo de isquemia caliente (extracción) y fría (preservación). Su consecuencia fisiopatológica más importante, es la inducción de lesiones celulares que se ven incrementadas tras el restablecimiento del flujo sanguíneo (reperusión) (2). Del profundo estudio de estos fenómenos han surgido hipótesis capaces de explicar parcialmente estos hallazgos, involucrando en las mismas a fenómenos de oxirreducción como los radicales libres del oxígeno (RLO) (3) (moléculas con un electrón desapareado en su última capa molecular, dotadas de amplia reactividad) o a fenómenos de no reflujo (4) (ausencia de flujo después del restablecimiento de la normal perfusión tisular). En un intento de proteger al hígado frente a las lesiones de isquemia reperusión, se han utilizado numerosos fármacos con mecanismos de acción conocidos: ATP-MgCl₂ (5) (aumento de la concentración de nucleótidos adenosínicos), Dopamina (6) (mejora el flujo hepático y activa el AMPc), Clorpromazina (7) (estabilización de enzimas lisomales), Verapamil (8) (bloqueo de los canales de calcio), PGE₂ (9) (vasodilatación y prevención de la agregación plaquetar), así como «scavenger» de RLO y antioxidantes. Entre estos últimos se ha utilizado alfatocoferol (10), coenzima Q10 (11), catalasa, superoxidodismutasa (12) y alopurinol (13). Sin embargo, la importancia de los RLO en la isquemia-reperusión hepática es todavía objeto de controversia.

En este trabajo, se valora la capacidad de diferentes antioxidantes para aminorar el deterioro funcional tras isquemia hepática normotérmica. Sobre un modelo de isquemia hepática normotérmica de 15 minutos de duración, asociada a hepatectomía del 70%, se han administrado superoxidodismutasa, ácido fólico y alopurinol antes de la reperusión. Su efectividad se ha valorado cuantificando citofotométricamente la actividad regenerativa del hígado residual a las 24 horas.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley, machos de 250 g de peso (estabulario de la Facultad de Medicina, UPV/EHU).

TABLA I
Series experimentales

- I. Hepatectomía 70%
- II. Isquemia hepática + Hepatectomía 70%
- III. Isquemia hepática + Hepatectomía 70% + S.O.D. (6 mg/kg)
- IV. Isquemia hepática + Hepatectomía 70% + Alopurinol (50 mg/kg)
- V. Isquemia hepática + Hepatectomía 70% + Acido Folfínico (2,5 mg/kg).

Todas las experiencias se han realizado entre las 9 y las 11 a.m., para evitar las variaciones debidas al ritmo circadiano. Todos los animales han tenido libre acceso a la comida y agua hasta el momento e inmediatamente después de las intervenciones.

Bajo anestesia con éter, se realizó un laparotomía media a través de la cual se procedió a la interrupción del flujo hepático mediante la colocación de clips de Yassargil a nivel del hilio hepático, durante 15 minutos. Para evitar la congestión esplácnica subsiguiente se clamparon el tronco celíaco y la arteria mesentérica superior a su salida de la aorta. A continuación, se cerró el abdomen. Una vez finalizado el periodo de isquemia, fueron retirados los clips vasculares, comprobándose la correcta reperusión mediante la visualización del latido de las arterias hepática y rectas del intestino. En todos los animales se realizó una hepatectomía del 70% según el metodo descrito por Higgins; ésta tuvo lugar inmediatamente después de la reperusión o como procedimiento aislado.

Los diferentes tratamientos se han administrado mediante perfusión intravenosa lenta (133 microl/min) controlada por una bomba de infusión (Lymphography Injector II, Cordis/Hyperion). Para ello, se procedió a disecar la vena femoral izquierda, introduciéndose en ella un catéter 27G (Biotrol-Farma) que se fijó mediante un clamp vascular. La perfusión se comenzó 10 minutos antes de la reperusión, finalizándose inmediatamente antes de ésta. Una vez concluida, se extrajo el catéter y se realizó hemostasia de la vena mediante compresión digital, observándose en todos los casos la permeabilidad del vaso.

Todos los fármacos se administraron en una única dosis, disueltos en 2 c.c. de suero fisiológico a partir de los diferentes preparados comerciales: superóxidodismutasa (SOD) 6 mg/kg (Ontosein-Orgoteina, Zambelletti; España); ácido fólnico 2,5 mg/kg (Lederfolin, Lederle; como sal cálcica) y alopurinol 50 mg/kg (sal sódica deshidratada, Sigma A-8003, disuelta en hidróxido sódico 1N (60 mg/cc), para posteriormente diluirlo en suero fisiológico hasta una concentración de 6 mg/cc). La experiencia consta en total de 5 series de 10 animales cada una (tabla I).

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas, extrayéndose un fragmento de hígado, que se incluyó en parafina. Sobre secciones histológicas de 5 micras de espesor, se realizó la tinción con reactivo de Schiff (reacción de Feulgen-Rossenbeck), cuantificándose el contenido en DNA de 100 núcleos hepatocitarios por sección, mediante un microespectrofotómetro ($\lambda=560$ nm). Una vez obtenidos los valores del

TABLA II
Porcentaje de hepatocitos en regeneración (%HR) y Gradiente Regenerativo (GR) en las distintas series experimentales

Serie	%H.R.	G.R.
Hepatectomía 70%	22,29 ± 9,69	1,61 ± 0,13
Isquemia hepática + Hepatectomía 70%	8,85 ± 9,38	1,74 ± 0,33
Hep. 70% + Isq. Hep. + SOD	15,66 ± 14,26	2,17 ± 0,41
Hep. 70% + Isq. Hep. + Alopurinol	6,42 ± 4,99	2,10 ± 0,23
Hep. 70% + Isq. Hep. + Acido folínico	29,10 ± 9,69	1,96 ± 0,23

contenido en DNA, en unidades arbitrarias, de cada animal, éstos fueron distribuidos en un histograma de frecuencias, a partir del cual, mediante el método descrito por Bartels (14), es posible calcular diferentes curvas gaussianas ajustadas sobre distintos niveles de ploidía. Esto nos permite calcular el porcentaje de hepatocitos en regeneración (%HR) y el gradiente regenerativo (GR=cociente del contenido medio en DNA de los hepatocitos regenerantes y el contenido medio en DNA de los hepatocitos estáticos).

Una vez calculados los datos correspondientes a cada animal, se calcularon los valores medios de cada serie. La comparación de resultados se realizó, dada la distribución no normal de los mismos, mediante el test de la suma de rangos, considerándose como significativos aquellos valores que mostraron una $p < 0,05$.

Todos estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo la normativa vigente sobre el cuidado y utilización de animales para investigación.

RESULTADOS

La hepatectomía del 70% ha inducido una importante respuesta regenerativa, con un %HR del 22,29% (tabla II) y un GR de 1,61.

En los animales sometidos a isquemia hepática normotérmica y hepatectomía parcial del 70%, observamos que la isquemia ha producido un descenso en la tasa regenerativa (%HR=8,85%), frente al grupo exclusivamente hepatectomizado ($p < 0,005$). Sin embargo, no ha modificado significativamente el GR (1,74 vs 1,61, $p=0,21$).

Si analizamos los resultados logrados tras los diferentes tratamientos frente al grupo no tratado (isquemia hepática más hepatectomía del 70%), observamos que el alopurinol no ha modificado significativamente el %HR (fig. 1a) (6,42 vs 8,85, $p=0,74$), aunque sí ha aumentado el GR (fig. 1b) (2,10 vs 1,74, $p < 0,01$). Por su parte, el tratamiento con SOD ha incrementado los valores de los dos parámetros regenerativos considerados, aunque sólo el aumento en el GR ha mostrado significación estadística (2,17 vs 1,74, $p < 0,05$).

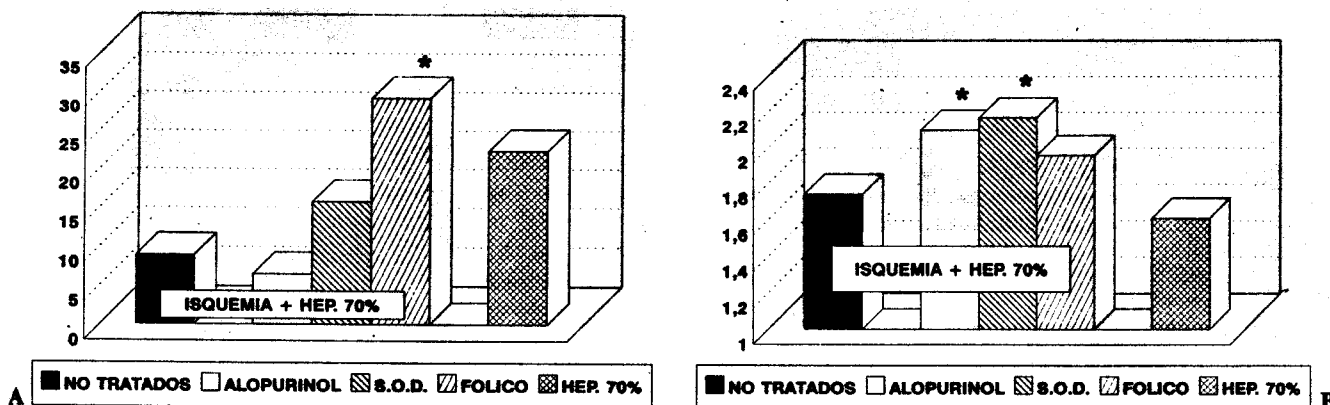


FIG. 1.—Modificaciones inducidas por los diferentes tratamientos antioxidantes sobre la regeneración hepatocitaria en el hígado isquémico. (A) Porcentaje de hepatocitos en regeneración. (B) Gradientes regenerativo. Las diferencias significativas frente a la serie de animales no tratados se señalan con un asterisco.

Por último, la administración de ácido fólico ha supuesto el mayor incremento en el %HR (29,10 vs 8,85, $p=0,0005$), alcanzando unos niveles de regeneración superponibles al grupo de animales exclusivamente hepatectomizados (29,10 vs 22,29, $p=0,15$). Además, el GR también se ha visto incrementado, mostrando diferencias frente al grupo de isquemia y hepatectomía, aunque sin significación estadística (1,96 vs 1,74, $p=0,21$). Dichas diferencias sí fueron significativas frente al grupo de animales sin isquemia (1,96 vs 1,61, $p<0,0005$).

DISCUSION

La participación de los RLO en el síndrome de isquemia y reperfusión ha sido probada en diferentes sistemas del organismo (9). Sin embargo, su participación en la isquemia hepática normotérmica y posterior reperfusión continúa siendo objeto de controversia. En un intento de aportar nuevos elementos de juicio, hemos diseñado este estudio en un modelo, validado con anterioridad (15), que utiliza la capacidad de los hepatocitos para responder a un estímulo regenerativo como parámetro objetivo del grado de incapacidad funcional provocado por el síndrome de reperfusión.

En estudios previos en nuestro laboratorio habíamos probado la eficacia del ácido fólico, el alopurinol y la SOD para atenuar las lesiones y/o aumentar la supervivencia en un modelo de isquemia y reperfusión intestinal en ratas (16). Apoyándonos en estos resultados, hemos elegido dichos fármacos para intentar atenuar las lesiones tras isquemia hepática normotérmica (fig. 2). Como ya habíamos mostrado con anterioridad (17), la isquemia provoca un descenso significativo en la tasa de regeneración hepatocitaria sin modificar el gradiente regenerativo. Es decir, disminuye el número de hepatocitos que entran en regeneración, pero aquéllos que regeneran lo hacen a un ritmo normal.

Superóxido-dismutasa

Son dos los aspectos a considerar en este fármaco. En primer lugar, la gran variabilidad individual observada en su acción sobre la tasa regenerativa, responsable de que los resultados obtenidos no sean significativos. Es éste un fenómeno que ya ha sido puesto de manifiesto por otros autores (18) y que puede explicarse, tanto por la corta vida media de este enzima (10 minutos) (19), como porque su actividad depende de la función renal y de las concentraciones intrahepáticas del fármaco.

Sin embargo, si nos centramos en el GR, sí que podemos afirmar que la SOD mejora la actividad regenerativa del hígado isquémico; apreciación ésta que concuerda con estudios realizados en modelos de isquemia y trasplante hepático (20-22). El fundamento de este efecto beneficioso habría que buscarlo únicamente en la capacidad de la SOD de descomponer los RLO originados durante la reperfusión; de tal manera, que su ausencia permitiría a los RLO atacar la membrana celular y el DNA (23), a la vez que los productos de degradación por ellos originados (hidroperóxido, aldehídos) podrían inhibir la actividad mitótica (24).

Sin embargo, Isaccson y Van Thiel (25) critican ampliamente la utilidad de la SOD, postulando que, administrada como fármaco, difícilmente alcanza el interior de los hepatocitos, máxime cuando en muchas ocasiones se administra dosis excesivamente bajas e incluso antes de establecerse la isquemia hepática.

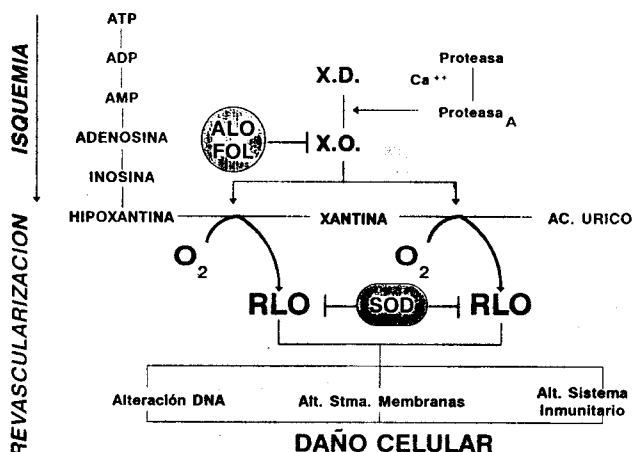


FIG. 2.—Mecanismos de acción de los diferentes tratamientos antioxidantes empleados en este trabajo. Implicaciones fisiopatológicas.

Ante estas afirmaciones, podemos resumir que existen grandes contradicciones acerca del efecto de la SOD sobre la isquemia hepática y más aún sobre la regeneración hepática. Sólo es posible afirmar que, presumiblemente, la acción «scavenger» de la SOD aminora las lesiones tras isquemia-reperusión hepática, siempre que esta sustancia se encuentre en concentraciones suficientes en el momento de la respuesta del hígado tras un estímulo regenerativo.

Alopurinol

A pesar de que tanto el alopurinol como el ácido fólico poseen un mecanismo de acción similar (inhibición de la xantina oxidasa, XO), estos fármacos muestran un comportamiento dispar: mientras el ácido fólico ha incrementado el %HR y no ha afectado al GR, el alopurinol ha aumentado el GR sin modificar el %HR.

Una primera explicación al fracaso del alopurinol, teniendo en cuenta que las dosis son similares a las utilizadas con éxito por otros autores, habría que buscarla en la vía y modo de administración. El alopurinol es un fármaco poco soluble en agua y en soluciones neutras, por lo que para su solubilización es necesario utilizar NaOH, obteniéndose una solución muy alcalina (26). Dicha solución puede haber repercutido negativamente sobre el hígado regenerante, contribuyendo a la ausencia de beneficio observada en el tratamiento con alopurinol. En estudios previos, hemos utilizado esta solución i.v. en un modelo de isquemia intestinal experimental, observándose una reducción en la mortalidad (16), aunque acompañada de un aumento estadísticamente significativo en los niveles de GOT y GPT, quedando sin determinar la causa de este ascenso. Ante esta situación, podemos pensar en la existencia de cierta toxicidad hepática por parte del alopurinol.

En segundo lugar, es de especial importancia el momento en el que se administra el alopurinol en un modelo de isquemia y reperusión hepática. En 1985, Kogama et al. observaron que el alopurinol no se mostraba efectivo cuando se administraba en el momento de la reperusión (27). Asimismo, Castillo et al. probaron la eficacia de este fármaco cuando se administraba antes de establecerse la isquemia (28). Ambos grupos sugieren que el alopurinol precisa de un tiempo suficiente para unirse a la XO y, por tanto, para inactivarla. Por su parte, García et al. demostraron que el alopurinol muestra su mayor eficacia a los 90 minutos de su administración por vía i.v. (29). En nuestro modelo, el alopurinol se ha administrado después de establecida la isquemia, 10 min. antes de la reperusión. Quizás este tiempo no sea suficiente para alcanzar un grado de efectividad válido para la inactivación de la XO.

Por último, cabría cuestionarse la participación de la XO en las lesiones por reperusión en el hígado de la rata. De hecho, a pesar de que el alopurinol se utiliza en algunas soluciones de preservación para el trasplante hepático, son varios los trabajos que sugieren la no involucración de la XO en el síndrome de reperusión hepático (30-31). Incluso se ha establecido que, en el caso del hígado, la conversión de xantino-deshidrogenasa a xantino-oxidasa durante la reperusión sólo se produce tras períodos de isquemia normotérmica de al menos dos horas de duración (32-33).

Acido fólico

Ahora bien, si aceptamos la hipótesis de la falta de importancia fisiopatológica de la XO en nuestro modelo, debemos buscar una justificación razonable al efecto asombrosamente positivo observado tras la administración de ácido fólico: incremento del %HR hasta niveles de regeneración superponibles al hígado no sometido a isquemia.

De hecho, parece exagerado pensar que el ácido fólico pudiera haber sido capaz de revertir o anular en su totalidad el efecto de la isquemia, únicamente en virtud de su capacidad de inhibición de la XO (34). Además, el gradiente regenerativo resultante, a pesar de no mostrar diferencias frente al grupo no tratado, sí muestra diferencias frente al grupo exclusivamente hepatectomizado (1,607 vs 1,955, $p < 0,005$); y, sin embargo, si el ácido fólico ejerciera su acción únicamente a nivel de la isquemia, este parámetro no debiera mostrar variaciones. Estos hechos, unidos a la consideración de que los efectos producidos por este fármaco son muy similares a los observados tras el tratamiento con Ciclosporina A (15), nos hacen sospechar que el ácido fólico puede poseer actividad hepatotrófica.

CONCLUSIONES

En resumen, el ácido fólico ha resultado útil para revertir el efecto depresor de la isquemia sobre la regeneración hepatocitaria, aunque desconocemos su mecanismo concreto de acción. La inhibición de la XO y un desconocido efecto hepatotrófico, parecen las hipótesis más probables.

Por su parte, el alopurinol no ha resultado eficaz en nuestro modelo, siendo necesarios ulteriores trabajos que determinen el origen de este fracaso. La realización de estudios de toxicidad, así como una correcta determinación de las concentraciones y momento óptimo de administración, aclararán nuestros resultados.

Por último, la SOD ha logrado aminorar las lesiones tras isquemia-reperusión hepática, aunque su corta vida media limita sus posibilidades clínicas. La utilización de formas de SOD con un vida media más larga (administrada con liposomas o en unión covalente a macrocélulas), quizá pueda abrir nuevas expectativas terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Gobierno Vasco, a través del Plan de Formación de Personal Investigador. Los fármacos utilizados han sido gentilmente suministrados por el Servicio de Farmacia del Hospital de Basurto.

Correspondencia:

Vicente Portugal Porras
Laboratorio de Cirugía Experimental
Facultad de Medicina y Odontología
48940 Lejona (Vizcaya)

BIBLIOGRAFIA

1. Huguet C, Gavelli A, Chicco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M y Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: Where is the limit? *Surgery* 1992; 111: 251-259.
2. Blankenstejn JD y Terpstra OT. Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 1991; 13: 1235-1250.
3. Gutteridge JMC. The role of oxygen radicals in tissue damage and ageing. *Pharmaceutical Journal* 1987; 10: 401-406.
4. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Gouth PH y Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after hepatic reperfusion: evidence for a role of superoxide anion. *Hepatology* 1992; 15: 507-514.
5. Chaudry IH, Stephan RN, Dean RE, Clemes MG y Baue AE. Use of magnesium-ATP following liver ischemia. *Magnesium* 1988; 7: 68-77.
6. Hasselgren P, Biber B y Fornander J. Improved blood flow and protein synthesis in the postischemic liver following infusion of dopamine. *J Surg Res* 1983; 34: 44-52.
7. Tokunaga Y, Wicomb W, Concepcion W, Nakazato P, Collins GM y Esquivel CO. Successful 20-hour rat liver preservation with chlorpromazine in sodium lactobionate sucrose solution. *Surgery* 1991; 110: 80-86.
8. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh, DB, Miller D y Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991; 213: 137-142.
9. Colletti LM, Burtch GD y Campbell DA. Prostaglandin E2 protects the isolated perfused rabbit liver from an oxygen free radical-induced injury. *Transplant Proc* 1990; 22: 2381-2383.
10. Lee SM y Clemens MG. Effect of alpha-tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1992; 15: 276-281.
11. Marubayashi S, Dohi K y Yamada K. Changes in the levels of endogenous coenzyme Q homologs, alpha-tocopherol and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and the effect of pretreatment with coenzyme Q10. *Biochim Biophys Acta* 1984; 797: 1-9.
12. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D y Butterfield A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 171: 120-124.
13. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG y Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987; 213: 23-28.
14. Bartels PH. Numerical evaluation of the cytologic data. I. Description of profiles. *Analytical Quantitative Cytology* 1979; 4: 20-28.
15. García-Alonso I, Portugal V, Iturburu I, López de Tejada I y Méndez J. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidantes en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 80: 237-241.
16. García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Díaz J, Iturburu I y Méndez J. Modificaciones inducidas por la ciclosporina A sobre la respuesta del hígado isquémico en la rata. *Cir Esp* 1990; 47: 393-397.
17. Banisters WH, Bannister JV y Rotilio G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987; 22: 111-180.
18. Gilham AG, Rall TW, Nies AS y Taylor P (eds). Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 8th edition, Pergamon Press 1990.
19. Romani F, Vertemati G, Frangi M, Aseni P, Monti R, Codeghini A y Belli L. Effect of superoxide dismutase on liver ischemia-reperfusion injury in the rat: a biochemical monitoring. *Eur Surg Res* 1988; 2: 335-350.
20. Ontell SJ, Makowka L, Trager J, Mazzaferro V, Ove P y Starzl Te. Pharmacological modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann Surg* 1989; 209: 200-210.
21. Marzi I, Knee J, Menger MD, Buhren V, Trentz O y Harbauer G. Reduction of leukocyte adherence and improvement of microcirculation following liver transplantation in the rat by rh-SOD. *Eur Surg Res* 1990; 22 (S1): 19.
22. Fridovich I. In: *Oxygen and living process*. Gilbert DL (ed), 1981; 250.
23. Bartoli GM, Minotti G, Borrello S y Galeotti T. A supposed role of superoxide dismutase in the control of tumor growth. In: *Oxy radicals and their scavenger systems*. Greenwald Ra (ed). Cellular and Medical aspects 1983; III: 179-184.
24. Isaacson Y y Van Thiel DH. The ischemic liver-do not resuscitate too much. *Hepatology* 1988; 8: 432-434.
25. Gez Rodríguez E, Griño J y Miravittles M. Alopurinol en líquido de perfusión en el trasplante renal. *Farm Clin* 1989; 6: 490-494.
26. Koyama I, Bulkley GB, Williams GM e Im MJ. The role of oxygen free radical in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. *Transplantation* 1985; 40: 590.
27. Castillo M, Toleo-Pereyra LH, Prough D, Sharpiro E, Gordon D y Choudhury S. Effective timing of allopurinol administration in the ischemic liver. *Transplantation* 1989; 47: 727-730.
28. García J, Martín C, Refoyo MA, Holgado M, Mariño E, Macías JF y Gómez A. Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine-oxidase inhibition. *J Surg Res* 1990; 48: 144-146.
29. Nordstrom G, Seeman T y Hasselgren P. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985; 97: 679-683.
30. Metzger J, Dore SP y Lauterburg H. Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: no evidence for a role of Xanthine Oxidase. *Hepatology* 1988; 8: 580-584.
31. Marubayashi S, Dohi K, Yamada K y Kawasaki T. Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver cell injury. *Surgery* 1991; 110: 537-543.
32. Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder J y Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 1987; 79: 1564-1570.
33. Lewis AS, Murphy L, McAlla C, Fleary M y Purcell S. Inhibition of mammalian xanthine oxidase by folate compounds and amethopterin (Folic acid is a potent inhibitor of xanthine oxidase). *J Biol Chem* 1984; 259: 12-15.