MATEUS ANTUNES NOGUEIRA

**Efeito do diazóxido nas lesões da isquemia/reperfusão
hepática: estudo experimental em ratos**

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

Programa de Cirurgia do Aparelho Digestivo

Orientador: Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar
Machado

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Mateus Antunes

Efeito do diazóxido nas lesões da isquemia/reperfusão hepática : estudo experimental em ratos / Mateus Antunes Nogueira. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: Marcel Cerqueira Cesar Machado.

Descritores: 1.Diazóxido 2.Fígado 3.Traumatismo por reperfusão 4.Pulmão
5.Rim 6.Citocinas 7.Mitocôndrias hepáticas 8.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-176/14

APOIO À PESQUISA

O desenvolvimento deste trabalho contou com o suporte financeiro de auxílio à pesquisa oferecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2010/019078-1).

Dedico esta tese às pessoas que mais amo:

Aos meus pais Nilo e Fátima, que me alicerçaram nos melhores preceitos da ética, do caráter, da meritocracia e da busca pelo conhecimento como a melhor forma de desenvolvimento pessoal.

Aos meus irmãos Nilinho e Cíntia.

E as minhas queridas companheiras Joyce, Thaís e Sophia. Agradeço a minha esposa Joyce por sempre estar ao meu lado e ter me apoiado nos momentos em que desejei mudanças, como no difícil momento da chegada prematura, mas abençoada, de nossa pequena Sophia, que me levou a querer mudanças e me trouxe, entre outras coisas, a realizar esta tese.

Tudo o que sou devo a vocês, minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores Luiz Augusto Carneiro D’Albuquerque e José Jukemura, por terem me recebido tão bem e me dado a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Herman, pela amizade e pelos conselhos, exemplo a ser seguido por sua competência e simplicidade.

Ao Professor Doutor Eliazar Chaib e a todos os funcionários do LIM/37, por sempre serem prestativos e colaborativos na realização do estudo. Em especial, lembro das minhas amigas Ana Maria de Mendonça Coelho, Sandra Nassa Sampietre e Nilza Aparecida Trindade Molan, sem as quais não teria conseguido concluir o estudo.

À secretária da pós-graduação Vilma de Jesus Libério, pela competência e solicitude.

À patologista Dra. Rosely Antunes Patzina e ao estatístico Márcio Augusto Diniz, por suas preciosas colaborações para esta tese.

Aos amigos médicos Arthur Cordeiro Neto, José Luis Lopes Côrrea, Maria Tereza Sodre e Paulo Antônio Lemos Curiati, por me ajudarem sempre que precisei me ausentar.

Ao amigo Dr. Marcos Antônio de Oliveira, pelo estímulo quando decidi pela realização da pós-graduação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Não poderia deixar de agradecer, em especial, a meu ilustre orientador, o Professor Marcel Cerqueira Cesar Machado, grande exemplo de cirurgião e pesquisador, incansável na busca do conhecimento. Saiba que tenho muito orgulho de ter sido seu aluno.

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com “*List of Journals Indexed in Index Medicus*”.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE MEDIDAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Aspectos éticos.....	12
3.2 Animais de experimentação.....	12
3.3 Diazóxido	13
3.4 Indução da isquemia/reperfusão hepática	13
3.5 Delineamento experimental	17
3.6 Coleta de materiais para análise:.....	19
3.7 Dosagem das transaminases.....	21
3.8 Dosagem da creatinina	21
3.9 Avaliação da peroxidação lipídica no tecido hepático.....	21
3.10 Avaliação das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais do tecido hepático.....	22
3.11 Dosagem nitrito-nitrato.....	23
3.12 Dosagem dos mediadores inflamatórios	23
3.13 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar.....	24
3.14 Atividade da mieloperoxidase pulmonar	25
3.15 Análise histológica do fígado	25
3.16 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Enzimas Hepáticas: AST e ALT	30
4.2 Creatinina.....	33

4.3 Peroxidação lipídica no tecido hepático	35
4.3.1 Comparação da peroxidação lipídica dos lobos hepáticos isquêmicos com a dos lobos não isquêmicos correspondentes	37
4.4 Função mitocondrial hepática	38
4.4.1 Função mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos	38
4.4.2 Função mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	42
4.5 Nitrito-Nitrato.....	43
4.6 Mediadores inflamatórios.....	44
4.6.1 TNF- α , IL-6 e IL-10	44
4.7 Permeabilidade vascular pulmonar.....	46
4.8 Atividade da mieloperoxidase pulmonar	47
4.9 Análise histológica do fígado	48
4.10 Graduação da lesão histológica dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	50
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÕES.....	61
7 ANEXOS.....	63
Anexo A - Valores séricos de AST em 4 horas após a reperfusão	63
Anexo B - Valores séricos de ALT em 4 horas após a reperfusão.....	64
Anexo C - Valores séricos de AST em 24 horas após a reperfusão	65
Anexo D - Valores séricos de ALT em 24 horas após a reperfusão	66
Anexo E - Valores séricos de creatinina em 4 horas após a reperfusão.....	67
Anexo F - Valores séricos de creatinina em 24 horas após a reperfusão	68
Anexo G - Valores TBARS (Peroxidação Lipídica) em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão	69
Anexo H - Função mitocondrial: valor estado 3 da respiração mitocondrial (S3) em 4 horas nos lobos isquêmicos e não isquêmicos após a reperfusão	70
Anexo I - Função mitocondrial: valor da razão do controle respiratório (RCR) em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão	71
Anexo J - Função mitocondrial: valor ADP/consumo de oxigênio em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão	72
Anexo K - Função mitocondrial: valor estado 4 (S4) da respiração mitocondrial (S3) em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão	73
Anexo L - Valores séricos de TNF- α em 4 horas após a reperfusão	74
Anexo M - Valores séricos de IL-6 em 4 horas após a reperfusão	75

Anexo N - Valores séricos de IL-10 em 4 horas após a reperfusão.....	76
Anexo O - Permeabilidade vascular pulmonar: azul de Evans no tecido pulmonar em 4 horas após a reperfusão	77
Anexo P - Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar em 4 horas após a reperfusão	78
Anexo Q - Histologia hepática: Escore de Quireze nos lobos isquêmicos e não isquêmicos em 4 horas após a reperfusão	79
Anexo R - Histologia hepática: Escore de Quireze nos lobos isquêmicos e não isquêmicos em 24 horas após a reperfusão	80
8 REFERÊNCIAS	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ADP/O	Razão ADP/consumo de oxigênio
AE	Azul de Evans
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CAM	Concentração alveolar mínima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Células de Kupffer
CONTR	Controle
CSEs	Células sinusoidais endoteliais
DIAZ	Diazóxido
DO	Densidade óptica
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
I/R	Isquemia/Reperfusão
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon- γ
KCl	Cloreto de potássio
LIM	Laboratório de Investigação Médica

MDA	Malondialdeído
mitoKATP	Canal mitocondrial de potássio sensível a ATP
MPO	Mieloperoxidase
Na/K/ATPase	Bomba de sódio e potássio dependente de ATP
Na ⁺	Íon sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
RCR	Razão de controle respiratório
S3	Estado 3 da respiração mitocondrial
S4	Estado 4 da respiração mitocondrial
SAL	Salina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
USA	<i>United States of America</i>

LISTA DE MEDIDAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
&	Apóstrofe
(%)	Frequências relativas
(N)	Frequências absolutas
±	Mais ou menos
®	Marca Registrada
cm	Centímetro
g/dL	Gramas por decilitro
oC	Graus Celsius
Hz	Hertz
µg/mg	Micrograma por miligramal
mg	Miligrama
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligrama por quilo
ml	Mililitro
ml/g	Mililitro por grama
ml/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mM	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nmol	Nanomole
nº	Número
rpm	Rotações por minuto
pg/ml	Picograma por mililitro
u/L	Unidades por litro
x	Vezez

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fisiopatologia Básica da lesão de I/R	5
Figura 2	Animal preparado para o procedimento cirúrgico.	14
Figura 3	Dissecção e reparo do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral esquerdo.....	15
Figura 4	Pinçamento do pedículo hepático com pinça vascular atraumática e consequente isquemia parcial dos lobos hepáticos mediano e lateral esquerdo.	16
Figura 5	Representação esquemática do delineamento experimental.	19

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Dosagem sérica de AST 4 horas após a reperfusão.	30
Gráfico 2	Dosagem sérica de ALT 4 horas após a reperfusão.....	31
Gráfico 3	Dosagem sérica de AST 24 horas após a reperfusão.	32
Gráfico 4	Dosagem sérica de ALT 24 horas após a reperfusão.....	33
Gráfico 5	Dosagem sérica de creatinina 4 horas após a reperfusão.....	34
Gráfico 6	Dosagem sérica de creatinina 24 horas após a reperfusão.....	35
Gráfico 7	TBARS no tecido hepático (Lobo isquêmico) 4 horas após a reperfusão.....	36
Gráfico 8	TBARS no tecido hepático (lobo não isquêmico) 4 horas após a reperfusão.....	37
Gráfico 9	Estado 3 da respiração (S3) no tecido hepático (lobo isquêmico)	39
Gráfico 10	Razão do controle respiratório (RCR) no tecido hepático (lobo isquêmico)	40
Gráfico 11	ADP/consumo de oxigênio (ADP/O) no tecido hepático (lobo isquêmico).	41
Gráfico 12	Estado 4 da respiração (S4) no tecido hepático (lobo isquêmico) 4 horas após a reperfusão.....	42
Gráfico 13	Nitrito-Nitrato no soro.....	43
Gráfico 14	TNF- α no soro.....	44
Gráfico 15	IL-6 no soro.....	45
Gráfico 16	IL-10 no soro.....	46
Gráfico 17	Azul de Evans no tecido pulmonar.	47
Gráfico 18	Mieloperoxidase no tecido pulmonar.	48

Gráfico 19	Histologia Hepática dos lobos isquêmicos após 4 horas após a reperfusão.....	49
Gráfico 20	Histologia Hepática dos lobos isquêmicos após 24 horas após a reperfusão.....	50
Gráfico 21	Histologia Hepática dos lobos não isquêmicos após 4 horas após a reperfusão.....	51
Gráfico 22	Histologia Hepática dos lobos não isquêmicos após 24 horas após a reperfusão.	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Graduação histológica da lesão de isquemia/reperfusão hepática proposta por Quireze <i>et al.</i> ⁴⁸27
-----------------	---

RESUMO

Nogueira MA. *Efeito do diazóxido nas lesões da isquemia/reperfusão hepática: estudo experimental em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: A lesão de isquemia/reperfusão hepática ocorre durante cirurgias hepáticas de grande porte, transplante de fígado e no trauma abdominal. A lesão de isquemia/reperfusão hepática ocasiona lesões no fígado e pode desencadear uma síndrome inflamatória sistêmica com lesões de órgãos a distância. Estudos anteriores demonstraram que o diazóxido protege outros órgãos (coração, rins, cérebro) da lesão de isquemia/reperfusão destes órgãos. **OBJETIVO:** Investigar o efeito da administração do diazóxido na lesão de isquemia/reperfusão hepática. **MÉTODOS:** Ratos Wistar machos foram divididos em 3 grupos. Em 2 grupos, os animais foram submetidos à isquemia hepática parcial realizada por clampeamento do pedículo dos lobos mediano e lateral anterior esquerdo durante uma hora sob ventilação mecânica. Grupo Salina (n=26): ratos receberam solução salina e Grupo Diazóxido (n=26): ratos receberam diazóxido EV (3.5mg/kg) 15 minutos antes da reperfusão hepática. No terceiro grupo, Grupo Controle (n = 22), os ratos foram submetidos apenas à anestesia e manipulação cirúrgica. Quatro e 24 horas após os procedimentos, amostras de sangue foram recolhidas para determinações de AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-10, de nitrito/nitrato, creatinina. Amostras teciduais do fígado foram analisadas para dosagem do malondialdeído (MDA), para o estudo das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais, e para a análise histológica. Pela coleta de tecido pulmonar, a permeabilidade vascular pulmonar e a atividade da mieloperoxidase (MPO) também foram determinados. **RESULTADOS:** Quatro horas após, a reperfusão o Grupo Diazóxido apresentou elevações de AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-10 e níveis séricos de nitrito/nitrato significativamente menores que o Grupo Controle (p < 0,05). Observou-se uma redução significativa da disfunção mitocondrial hepática no Grupo Diazóxido em comparação com o Grupo Controle (p <0,05). Não foram observadas diferenças no conteúdo de MDA fígado, na creatinina sérica e na permeabilidade vascular pulmonar, e na atividade da MPO entre os grupos. Vinte e quatro horas após, a reperfusão o Grupo Diazóxido registrou uma redução de AST, ALT quando comparado ao Grupo Controle (p < 0,05). **CONCLUSÃO:** O Diazóxido mantém a função mitocondrial do fígado, aumenta a tolerância fígado à lesão de Isquemia/Reperfusão e reduz a resposta inflamatória sistêmica. Esses efeitos requerem comprovações adicionais para o uso na prática clínica.

Descritores: Diazóxido; Fígado; Traumatismo por reperfusão; Pulmão; Rim; Citocinas; Mitocôndrias hepáticas; Ratos Wistar.

SUMMARY

Nogueira MA. *Effect of diazoxide in the lesions of ischemia / reperfusion liver: experimental study in rats* [Thesis]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: Significant liver ischemia/reperfusion injury can occur during hepatic surgeries, liver transplantation and abdominal trauma. Hepatic ischemia/reperfusion can trigger a local and systemic inflammatory syndrome. Previous studies have shown that diazoxide protects other organs (heart, kidneys, brain) from ischemia/reperfusion injury. **AIM:** To investigate the effect of diazoxide administration on liver ischemic/reperfusion injury. **METHODS:** Wistar male rats were divided into 3 groups. In two groups the rats underwent partial liver ischemia performed by clamping the pedicle from medium and left anterior lateral segments during an hour under mechanical ventilation. Saline Group (n=26): rats received saline and Diazoxide Group (n=26): rats received IV diazoxide (3.5mg/kg) 15 minutes before liver reperfusion. The third group, the Control Group (n=22) the rats underwent only anesthesia and surgical manipulation. Four and 24 hours after the procedure blood were collected for determinations of AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-10, nitrite/nitrate, creatinine. Liver tissues were assembled for mitochondrial oxidation and phosphorylation, malondialdehyde (MDA) content, and histologic analysis. Pulmonary vascular permeability and myeloperoxidase (MPO) were also determined. **RESULTS:** Four hours after reperfusion Diazoxide Group presented elevation of AST, ALT, TNF- α , IL-6, IL-10 and nitrite/nitrate serum levels significantly lower than Control Group ($p<0.05$). A significant reduction on liver mitochondrial dysfunction were observed in Diazoxide Group compared to Control Group ($p<0.05$). No differences in liver MDA content, serum creatinine and in pulmonary vascular permeability and MPO activity were observed between groups. Twenty four hours after reperfusion Diazoxide Group showed a reduction of AST, ALT and TGF β 1 serum levels when compared to Control group ($p<0.05$). **CONCLUSION:** Diazoxide maintains liver mitochondrial function, increases liver tolerance to I/R injury, and reduces systemic inflammatory response. These effects require further evaluations for using in a clinical setting.

Descriptors: Diazoxide; Liver; Reperfusion injury; Lung; Kidney; Cytokines; Liver mitochondria; Wistar rats.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Denominam-se lesões de isquemia/reperfusão aquelas decorrentes do agravamento das lesões isquêmicas de um órgão ou tecido quando se restabelece a circulação e, conseqüentemente, o fornecimento de oxigênio.^{1,2}

O estudo da lesão de I/R no tecido hepático tem grande importância na prática clínica, desde que períodos de isquemia transitória do fígado estão presentes em diversos procedimentos cirúrgicos, destacando-se as ressecções hepáticas amplas no tratamento de tumores, o manuseio de traumas hepáticos extensos e, em especial, o transplante de fígado. Este fenômeno também pode estar envolvido em situações patológicas, como, por exemplo, no choque hipovolêmico, em alguns tipos de intoxicação, nas doenças veno-oclusivas e na síndrome de Budd-Chiari.^{1,3-5}

A lesão de isquemia/reperfusão hepática intensa desencadeia sérias consequências. Localmente, o dano hepatocelular compromete a função do órgão e pode levar à sua inviabilidade, o que, no caso do transplante, acarreta perda do enxerto e, nos casos de ressecções hepáticas, à insuficiência hepática ou, mesmo, à morte do doente. Sistemicamente, é observado o comprometimento de órgãos a distância, como pulmões e rins.⁶⁻

⁸ Estas alterações sistêmicas, por sua vez, podem agravar ainda mais a lesão do fígado comprometendo sua função.

Na fase de isquemia, a interrupção da fosforilação oxidativa compromete a capacidade de produção de energia pelas mitocôndrias, com consequente degradação do ATP e acúmulo de seus metabólitos, inosina e hipoxantina, no citosol celular.

A redução do ATP compromete a função da bomba de Na/K dependente de ATP da membrana celular, levando ao aumento dos níveis de sódio e água intracelulares, e, consequentemente, a edema celular.^{4,9}

Com a deficiência de ATP e a alteração da homeostase celular, há, também, o comprometimento das membranas das organelas celulares levando à liberação do cálcio estocado, principalmente no retículo endoplasmático. O aumento dos níveis de cálcio no citosol e nas mitocôndrias leva à ativação de enzimas hidrolíticas cálcio-dependentes, fosfolipases, nucleases e proteases, que danificam globalmente as estruturas celulares. O dano mitocondrial resultante da ação destas enzimas diminui ainda mais a capacidade de produção energética celular.

O aumento do cálcio intracelular e, principalmente, mitocondrial é reconhecido como tendo um papel-chave na fisiopatologia da lesão de I/R, sendo que o nível do aumento do cálcio nas fases iniciais da lesão está diretamente relacionado ao grau do dano tecidual subsequente.⁹⁻¹¹

Durante o período de isquemia, o edema das células de Kupffer e das células endoteliais associados à perda do delicado equilíbrio entre as concentrações de óxido nítrico e endotelina induzem à vasonconstrição e estreitamento do lúmen sinusoidal. O turbilhonamento e a lentificação do fluxo sanguíneo promovem leucotaxia e agregação plaquetária

intrasinusoidal, prejudicando, ainda mais, o fluxo sanguíneo e, até mesmo, provocando a oclusão de alguns capilares. Na reperfusão do fígado isquêmico, este colapso da microcirculação mantém áreas de isquemia no parênquima hepático, num fenômeno conhecido como “não reperfusão” (*no-reflow*).^{9,12}

Na fase de reperfusão, com o restabelecimento da oferta de oxigênio e com a restauração da fosforilação oxidativa, ocorre, também, o estresse oxidativo, que agrava as lesões isquêmicas.^{13,14}

Na lesão hepática de I/R, reconhecem-se duas fases: a inicial e a tardia. A fase inicial, que dura de 2 a 6 horas, é caracterizada pelo estresse oxidativo em que o abrupto aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) está diretamente relacionado ao dano hepatocelular. Nesta fase, há, também, a ativação das células de Kupffer e de neutrófilos, as principais responsáveis pela cascata de eventos que culmina no intenso infiltrado inflamatório que caracteriza a fase tardia, a qual dura até 48 horas.^{15,16}

Com a reoxigenação, ocorre a oxidação da hipoxantina acumulada no citosol celular pela degradação do ATP e consequente liberação de EROs; cujas principais são o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e a hidroxila. Estas são citotóxicas, danificam as estruturas celulares e levam à morte celular. As EROs também atuam como mensageiros, atraindo e recrutando células inflamatórias.^{13,14}

As células de Kupffer são ativadas nos estágios iniciais da reperfusão. São importantes fontes de EROs e liberam citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa, prostaglandinas e interleucinas 1 e 6) e anti-

inflamatórias (interleucinas 3 e 10). Estas citocinas atuam no recrutamento de polimorfonucleares, amplificam e perpetuam a lesão ao estimularem a liberação adicional de EROs, proteases e citocinas.¹⁷

Os neutrófilos, acumulados no fígado já nos estágios iniciais da reperfusão, são importantes fontes de EROs e proteases (Figura 1).^{18,19}

Figura 1 - Fisiopatologia Básica da lesão de I/R

Esta cascata de eventos leva a danos graves e à morte celular no parênquima hepático. Necrose e apoptose ocorrem simultaneamente como mecanismos fisiopatológicos de morte hepatocelular na lesão de I/R do fígado.^{20,21}

A liberação aumentada de EROS e das diversas citocinas envolvidas na lesão de I/R hepática são, também, responsáveis pela síndrome inflamatória sistêmica (SIRS) que pode levar à lesão de órgãos à distância, como os pulmões, rins, e a insuficiência de múltiplos órgãos, observada nos casos mais graves.⁶⁻⁸

A indução de lesão não letal que promove uma resistência ulterior à lesão letal denomina-se pré-condicionamento. A indução de períodos curtos de isquemia para reduzir as lesões decorrentes de períodos prolongados de isquemia denomina-se pré-condicionamento isquêmico. Dentre os diversos estudos realizados com o objetivo de se amenizar a lesão de I/R hepática, estão o pré-condicionamento isquêmico e o uso de substâncias, como antioxidantes, antagonistas de fatores ativadores de plaquetas, anti-TNF- α , solução salina hipertônica, glutamina, entre outras.²²⁻²⁷

Estudos sobre o pré-condicionamento isquêmico no tratamento da lesão de I/R hepática e de outros órgãos demonstraram melhora das funções mitocondriais. Observaram-se a manutenção da integridade da membrana mitocondrial e a preservação da função respiratória da organela. Em decorrência destes fatos, o pré-condicionamento isquêmico é reconhecido como método terapêutico que ameniza, de modo significativo, os efeitos deletérios da lesão de I/R.^{28,29}

De acordo com estes estudos, o mecanismo pelo qual o pré-condicionamento isquêmico promove a manutenção das funções mitocôndrias envolveria a ativação do canal mitocondrial de potássio sensível a ATP (mitoKATP). Breves períodos de isquemia levam ao aumento da produção de EROs pela cadeia de transporte de elétrons. Estes aumentos sutis na concentração de EROs na mitocôndria seriam responsáveis pela ativação do mitoKATP.^{30,31}

Com a ativação do mitoKATP, observa-se a regulação do volume mitocondrial, bem como, menor captação de cálcio pela mitocôndria durante a isquemia. Consequentemente, há menor ativação de fosfolipases, nucleases e proteases cálcio dependentes. Associado a isso, observa-se a preservação energética do tecido durante a isquemia, levando a uma melhora da fosforilação oxidativa pós-isquêmica e menor geração de EROS quando da reperfusão. Tudo isso corrobora para uma lesão de I/R de menor magnitude.³¹

Diante disso, foi proposto o pré-condicionamento farmacológico, que seria o uso de substâncias ativadoras do mitoKATP como terapêutica da lesão de I/R. O diazóxido é o agonista do mitoKATP mais amplamente utilizado por sua ação seletiva nos canais de potássio mitocondriais (2.000 vezes maior que em relação aos canais de potássio da membrana celular).³²⁻³⁴

Diversos estudos já foram realizados sobre o efeito do diazóxido nas lesões de I/R em órgãos e tecidos, como, por exemplo, coração, rins, musculatura esquelética, sistema nervoso central, entre outros. Estas

pesquisas apresentaram resultados satisfatórios ao amenizar a amplitude dos efeitos deletérios das lesões.^{32,34-37}

A comprovação da presença de mitoKATP nas mitocôndrias hepáticas pressupõe a possibilidade de que sua abertura possa influenciar benéficamente o fenômeno de I/R hepática.⁶³

Considerando-se este conjunto de informações, é possível que a utilização do diazóxido venha a ser útil na redução das lesões locais e sistêmicas da I/R hepática.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Estudar os efeitos locais e sistêmicos da administração do diazóxido na lesão de I/R hepática em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – LIM/37 da Disciplina de Transplante e Cirurgia de Fígado do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, HC-FMUSP N^o 186/10), e foram respeitadas as normas de proteção e cuidados aos animais de experimentação segundo o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 1996.*

3.2 Animais de experimentação

Foram utilizados 74 *Rattus Albinus* machos da linhagem Wistar. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os ratos foram mantidos no LIM/37 em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada entre 20 e 22° *Celsius*, alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda.) e hidratados com água filtrada *ad libitum*.

3.3 Diazóxido

O diazóxido (D9035, *Sigma Chemical Company*, St. Louis, Missouri) foi utilizado em uma dose de 3,5 mg/kg e administrado por via endovenosa pela veia peniana.

3.4 Indução da isquemia/reperfusão hepática

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar^R, Cristália) a 30 mg/kg e cloridrato de xilazina 2% (Rompum^R, Bayer) a 30 mg/kg. Com a administração destas drogas, os animais foram mantidos anestesiados durante todo o procedimento, sob observação contínua. Doses adicionais das medicações anestésicas foram administradas quando necessário. Em seguida, os animais foram submetidos à intubação orotraqueal com cateter número 16 (Jelco^R) e colocados em ventilação mecânica (*Havard Rodent Ventilator Model 683*,

USA) na frequência de 60 ciclos por minuto e com volume corrente de 0,08 ml por grama de peso (Figura 2).²⁶

Figura 2 - Animal preparado para o procedimento cirúrgico.

Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos aquecidos por lâmpada halógena de 45W e 127V. A temperatura corpórea foi monitorada por termômetro retal digital (YSI Precision 4000A Thermometer, USA) e mantida entre 35 e 37°C.

A seguir, foi infundida, por via endovenosa por meio da veia peniana, solução salina fisiológica (Grupos Controle e Salina) ou diazóxido (D9035,

Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri) na dose de 3,5 mg/kg (Grupo Diazóxido). O volume infundido de solução salina nos Grupos Controle e Salina foi o correspondente ao volume infundido da solução de diazóxido a 3,5 mg /ml de acordo com o peso do animal.

A cirurgia foi realizada por laparotomia mediana ampla, se estendendo por, aproximadamente, 4 cm a partir do apêndice xifoide. Em seguida, foi realizada a dissecação do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral. Quinze minutos após a infusão da solução salina fisiológica (Grupos Controle e Salina) ou do diazóxido (Grupo Diazóxido), este pedículo foi ocluído com uma pinça microvascular atraumática (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Dissecação e reparo do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral esquerdo.

Figura 4 - Pinçamento do pedículo hepático com pinça vascular atraumática e consequente isquemia parcial dos lobos hepáticos mediano e lateral esquerdo.

Esta técnica provoca uma isquemia de, aproximadamente, 70% do parênquima hepático e mantém a perfusão dos lobos caudado superior, caudado inferior, superior direito e inferior direito. Por este método, se impede a estase venosa e isquemia intestinal, que pode ocorrer na oclusão total do hilo hepático, permitindo a avaliação exclusiva das lesões secundárias à isquemia/reperfusão hepática.^{26,38,39}

A incisão abdominal foi fechada com *mononylon* 4-0, logo após a indução da isquemia, a fim de se prevenir a desidratação do animal, e foi reaberta após uma hora de isquemia a fim de se remover a pinça, promovendo-se a reperfusão dos lobos isquêmicos, sendo, então, fechada, novamente, com *mononaylon* 4-0. O animal foi, então, recuperado da anestesia, extubado e, quando bem acordado, colocado em gaiola individual.

No pós-operatório, para analgesia, foi oferecido a todos os animais água com adição de dipirona (10 gotas de dipirona em 60 ml de água). Os animais foram também mantidos em ambiente com controle de temperatura entre 22 e 24°C.

3.5 Delineamento experimental

Os animais foram submetidos à intubação orotraqueal e distribuídos nos seguintes grupos (Figura 5):

Controle (CONTR) (n=22): animais receberam infusão da solução salina fisiológica via endovenosa, 15 minutos antes de serem submetidos à manipulação cirúrgica do fígado, sem indução de isquemia e divididos nos subgrupos*:

CONTR_{4hs} (n=16): avaliados 5 horas após o início da manipulação cirúrgica**;

CONTR_{24hs} (n=6): avaliados 25 horas após o início da manipulação cirúrgica;

Salina (SAL) (n=26): animais receberam solução salina fisiológica por via endovenosa 15 minutos antes de serem submetidos a uma hora de isquemia hepática e foram divididos nos subgrupos:

SAL_{4hs} (n=16): avaliados após 4 horas de reperfusão**;

SAL_{24hs} (n=10): avaliados após 24 horas de reperfusão.

Diazóxido (DIAZ) (n=26): animais receberam diazóxido (3,5mg/Kg) por via endovenosa 15 minutos antes de serem submetidos a uma hora de isquemia hepática e foram divididos nos subgrupos:

DIAZ_{4hs} (n=16): avaliados após 4 horas de reperfusão**;

DIAZ_{24hs} (n=10): avaliados após 24 horas de reperfusão.

*Os animais do grupo-controle foram avaliados em 5 e 25 horas após o início da manipulação cirúrgica porque os animais dos grupos SAL e DIAZ foram avaliados em 5 horas (1 hora de isquemia e mais 4 horas de reperfusão) e, em 25 horas (1 hora de isquemia e mais 24 horas de reperfusão) após o início da isquemia.

**** Avaliação 4 horas após a reperfusão:**

Dez destes animais dos grupos com I/R hepática e do grupo-controle foram utilizados para avaliação das transaminases, creatinina, AE, MPO, MDA e histologia.

Seis destes animais foram utilizados para avaliação da função mitocondrial hepática e dosagem das citocinas, já que existe interferência do corante azul de Evans na determinação destas substâncias.

**** Avaliação 24 horas após a reperfusão:**

Dez destes animais dos grupos com I/R hepática e do grupo-controle foram utilizados para avaliação das transaminases, e creatinina e histologia.

O número de animais em cada grupo foi calculado em função de trabalhos prévios e na variabilidade das determinações laboratoriais.

Figura 5 - Representação esquemática do delineamento experimental.

3.6 Coleta de materiais para análise:

Quinze minutos antes da coleta de materiais, os animais foram anestesiados com cetamina 5% na dose de 40 mg/kg, submetidos à laparotomia e os materiais foram coletados de acordo com o delineamento do estudo (Figura 1).

Cinco ml de sangue foram obtidos por punção cardíaca transdiafragmática, após o que os animais foram sacrificados por secção da

aorta abdominal e da veia cava inferior. O fígado foi removido e amostras dos lobos isquêmicos e não isquêmicos foram retiradas para avaliações da função mitocondrial, da peroxidação lipídica e histopatológicas.

Como o corante azul de Evans, usado no estudo da avaliação da permeabilidade vascular pulmonar, interfere na dosagem dos mediadores inflamatórios, a análise destes parâmetros foi realizada em separado nos animais de cada grupo conforme o delineamento experimental (Figura 1).

Nos animais em que foi realizada a avaliação da permeabilidade vascular pulmonar, foi administrado o corante azul de Evans (Sigma-Chemical Company, USA) na dose de 20 mg/kg por via endovenosa, pela veia peniana, logo após a indução anestésica que precede o início da coleta dos materiais. Nestes animais, após o sacrifício e a retirada do fígado, a artéria pulmonar foi cateterizada, via ventrículo direito, com cateter de 2,0 mm de diâmetro (Silastic, Dow Corning, nº 602.175), e o pulmão lavado com 30 a 50 mL de solução salina fisiológica, administrada na velocidade de 10 mL/minuto. Em seguida, os pulmões foram removidos, e encaminhados para a extração do azul de Evans e quantificação da mieloperoxidase tecidual.

Para o descarte, os animais foram colocados em sacos plásticos brancos, próprios para o descarte, e incinerados conforme as normas da Instituição.

3.7 Dosagem das transaminases

As transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram avaliadas como indicadores de lesão hepática. A quantificação das transaminases foi realizada pelo método ultravioleta otimizado (COBAS MIRA, Roche) de acordo com a *International Federation of Clinical Chemistry*. Os resultados foram expressos em U/L.

3.8 Dosagem da creatinina

A dosagem de creatinina foi avaliada como indicador de lesão renal. A quantificação foi realizada pelo método Jaffe modificado (Roche).

3.9 Avaliação da peroxidação lipídica no tecido hepático

A quantificação da peroxidação lipídica nos lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos foi realizada com a determinação da concentração de malondialdeído (MDA) por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram homogeneizadas em KCl, centrifugadas e, no sobrenadante, foi adicionada uma solução contendo ácido tiobarbitúrico, duodecilsulfato de sódio, ácido acético glacial e água destilada. A mistura foi aquecida a 90°C por 45 minutos. Após o resfriamento

em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos. As concentrações dos produtos da peroxidação lipídica foram expressas pela concentração de TBARS. Os resultados foram expressos em nmolMDA/mg proteína.⁴⁰

3.10 Avaliação das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais do tecido hepático

A função mitocondrial hepática foi estudada nos lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos. Estes lobos, que foram separados após a retirada do fígado, foram imersos em solução de homogeneização para a extração de mitocôndrias.⁴¹

O estudo polarográfico da mitocôndria, utilizando o oxígrafo 5/6 H (*Gilson Medical Eletronics, Inc*) com eletrodo de oxigênio em temperatura controlada a 28° C (*Clarck, Yellow Springs Instruments Co, Yellow Springs, Ohio*), foi utilizado para a determinação do consumo de oxigênio.⁴²

Uma porção da suspensão de mitocôndrias foi acrescentada ao meio da reação no compartimento de vidro do eletrodo de oxigênio. A seguir, o substrato energético succinato de potássio foi adicionado, e o estado basal (ou estado 4 - S4) da respiração mitocondrial registrado.

A fosforilação do ADP em ATP, observada no estado ativado da respiração mitocondrial (ou estado 3 – S3), foi induzida pelo acréscimo de adenosina difosfato (ADP, *Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri*).

Quando do esgotamento de todo o ADP do meio, a respiração independente de ADP (S4) foi registrada novamente pelo oxígrafo.

A razão do controle respiratório (RCR) e a razão ADP/consumo de oxigênio (ADP/O) foram consideradas como índices das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais. A RCR foi calculada como razão entre a velocidade do consumo de oxigênio na presença de ADP (S3) e a velocidade do consumo de oxigênio na ausência de ADP (S4).⁴³

Os estados S3 e S4 foram expressos em ng de átomos de oxigênio/mg de proteína/minuto.⁴⁴

3.11 Dosagem nitrito-nitrato

A dosagem dos níveis séricos de nitrito-nitrato nas amostras foi realizada por meio da quantificação por ensaio imunoenzimático (ELISA, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA) e utilizada como índice da produção de óxido nítrico.

3.12 Dosagem dos mediadores inflamatórios

As citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) (*Invitrogen Corporation*, Camarillo, CA, USA) nas amostras de soro. Depois da coleta, as amostras de sangue

foram, imediatamente, centrifugadas por 10 minutos a 0°C e o sobrenadante foi estocado a -20° C.

3.13 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar

A avaliação da permeabilidade vascular pulmonar foi efetuada pela quantificação do corante azul de Evans extraído das amostras de pulmão que foram colhidas. Quando este corante é administrado por via endovenosa, ele se liga a proteínas séricas, principalmente à albumina. O processo inflamatório leva ao aumento da permeabilidade capilar pulmonar, o que leva ao extravasamento e à deposição intersticial do complexo proteína-azul de Evans.

Um fragmento do pulmão de cada animal foi incubado em tubo de ensaio com formamida (BDH Labs, England) na dose de 4 µg/mg de tecido, durante 24 horas, em temperatura ambiente. O corante extraído foi quantificado por espectrofotometria pelo espectrofotômetro ELX 808 *Ultra Microplate Reader* (Bio-Tek Instruments, Inc, USA) com comprimento de onda de 620 nm. Os resultados foram expressos em mg de azul de Evans/g de tecido seco.⁴⁵

3.14 Atividade da mieloperoxidase pulmonar

A atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO) foi utilizada como indicador da quantidade de neutrófilos sequestrados no pulmão. As amostras de tecido pulmonar foram homogeneizadas com o homogeneizador Polytron usando-se tampão PBS, com 0,5% de hexadecil e 5mM de EDTA, em pH 6,0. Depois de homogeneizadas, foram submetidas a ondas ultrassonográficas de 40 Hz e centrifugadas a 3000g por minuto. A atividade da MPO no sobrenadante foi quantificada por densidade óptica (DO) a 490 nm, resultante da decomposição de H_2O_2 na presença de O-dianisidina (Sigma). Os resultados foram expressos em DO a 490nm.^{46,47}

3.15 Análise histológica do fígado

Amostras representativas dos lobos isquêmicos e não isquêmicos de cada animal foram fixadas em formol salino a 10% e submetidos a processamento histológico de rotina. Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina e eosina, e submetidos a um único patologista, em estudo cego, que analisou as seguintes variáveis morfológicas (Quadro1):

- a- Tumefação hepatocelular: alargamento e clareamento citoplasmáticos, também podendo ocorrer obliteração sinusoidal.

Este fenômeno é potencialmente reversível e está associado ao edema celular;

- b- Retração hepatocelular: picnose nuclear, eosinofilia citoplasmática e redução do volume celular. Está associada à perda de água intracelular. Este fenômeno é irreversível e é tido como expressão fenotípica de apoptose;
- c- Esteatose hepatocelular: presença de gotículas intracelulares claras e bem delimitadas;
- d- Necrose de coagulação: células com citoplasmas róseos de limites imprecisos e núcleos picnóticos ou, até mesmo, células desprovidas de núcleos;
- e- Inflamação lobular: áreas de necrose focal permeadas por células inflamatórias;
- f- Inflamação portal: aumento da população de células inflamatórias no espaço-porta;
- g- Celularidade sinusoidal: hiperplasia ou hipertrofia de células sinusoidais.

Todas as variáveis estudadas foram graduadas de zero a três, em que:

- zero: ausência da variável pesquisada;
- um: presença discreta e focal;
- dois: presença moderada;
- três: presença intensa.

Para analisar a intensidade da lesão de I/R hepática, foi definido o critério de graduação global de cada amostra obtido pela somatória dos pontos de cada variável, sendo dado para a variável necrose de coagulação o peso 3, por ser esta a que mais se associa com o prognóstico da lesão I/R. Esta graduação global foi dada aos lobos isquêmicos e não isquêmicos.⁴⁸

Quadro 1 - Graduação histológica da lesão de isquemia/reperfusão hepática proposta por Quireze *et al.*⁴⁸

TUMEFAÇÃO HEPATOCELULAR	GRADUAÇÃO
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Grave	3
RETRAÇÃO HEPATOCELULAR	
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Grave	3
ESTEATOSE HEPATOCELULAR	
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Grave	3
NECROSE DE COAGULAÇÃO	
Ausente	0
Leve	3 (1X3)
Moderada	6 (2X3)
Grave	9 (3X3)
INFLAMAÇÃO LOBULAR	
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Grave	3
INFLAMAÇÃO PORTAL	
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Grave	3
CELULARIDADE SINUSOIDAL	
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Grave	3

3.16 Análise estatística

A análise descritiva foi realizada por meio de gráficos e tabelas. Utilizou-se médias, medianas, desvio-padrão, erro-padrão e desvio interquartilico para variáveis quantitativas, e frequências absolutas (N) e frequências relativas (%) para variáveis qualitativas.

A comparação entre múltiplos grupos foi realizada por meio dos procedimentos estatísticos ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguidos, quando necessário, pelo procedimento de comparações múltiplas por Tukey ou Tukey não paramétrico, respectivamente. Na impossibilidade de realização tanto do procedimento ANOVA quanto do procedimento Kruskal-Wallis, comparações dois a dois foram realizadas diretamente pelo teste de Tukey não paramétrico.^{64,65}

Utilizou-se o programa R versão 2.15.2 (*The R Foundation for Statistical Computing*) para análise estatística e adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Enzimas Hepáticas: AST e ALT

Os níveis séricos de AST e ALT dos dois grupos que foram submetidos a I/R (salina e diazóxido) 4 horas após a reperfusão foram estatisticamente maiores que os níveis do grupo-controle. Observamos redução estatisticamente significativa nos níveis séricos de AST (Anexo A) e ALT 4 (Anexo B) horas após a reperfusão nos animais tratados com diazóxido em relação aos animais do grupo salina.

Gráfico 1 - Dosagem sérica de AST 4 horas após a reperfusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido).

Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=16

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p=0$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0,005$

Gráfico 2 - Dosagem sérica de ALT 4 horas após a reperfusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=16

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p=0$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0,012$

Observamos redução significativa nos níveis séricos de AST (Anexo C) e tendência de redução nos níveis séricos de ALT (Anexo D) 24 horas após a reperfusão nos animais tratados com diazóxido em comparação com os animais do grupo salina.

Gráfico 3 - Dosagem sérica de AST 24 horas após a reperusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10

Tukey não paramétrico.

DIAZ - CONT $p=0$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0,085$

Gráfico 4 - Dosagem sérica de ALT 24 horas após a reperusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10

Tukey não paramétrico.

DIAZ - CONT $p=0$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0,232$

4.2 Creatinina

Não observamos diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de creatinina nos três grupos de animais estudados (Anexos E e F).

Gráfico 5 - Dosagem sérica de creatinina 4 horas após a reperfusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10.

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p=0,506$

SAL - CONT $p=0,012$

SAL - DIAZ $p=0,837$

Gráfico 6 - Dosagem sérica de creatinina 24 horas após a reperusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10.

Kruskal-Wallis $p = 0,203$

4.3 Peroxidação lipídica no tecido hepático

Os resultados da peroxidação lipídica foram avaliados pela determinação da concentração TBARS no tecido hepático. Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo tratados com diazóxido quando comparados com os animais do grupo salina tanto nos lobos isquêmicos como nos lobos não isquêmicos, e, também, entre os animais do grupo-controle (Anexo G).

Gráfico 7 - TBARS no tecido hepático (Lobo isquêmico) 4 horas após a reperfusão. Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10
Kruskal-Wallis $p=0,119$

Gráfico 8 - TBARS no tecido hepático (lobo não isquêmico) 4 horas após a reperfusão. Grupos de ratos submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10
Kruskal-Wallis $p=0,133$

4.3.1 Comparação da peroxidação lipídica dos lobos hepáticos isquêmicos com a dos lobos não isquêmicos correspondentes

Os níveis de TBARS nos lobos isquêmicos dos dois grupos que foram submetidos a I/R (salina e diazóxido) não apresentaram diferença significativa quando comparados com os lobos não isquêmicos correspondentes.

4.4 Função mitocondrial hepática

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

4.4.1 Função mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

Observamos aumento estatisticamente significativo na avaliação do S3, RCR e ADP/O nos animais tratados com diazóxido expressando melhora da função mitocondrial, comparando com os animais do grupo salina (Anexos H, I e J).

O grupo diazóxido não apresentou diferenças significantes quando comparado ao grupo-controle, em relação aos resultados de S3 e ADP/O; entretanto, obteve valores menores em relação aos resultados de RCR.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos resultados da avaliação do S4 entre os três grupos estudados (Anexo K).

Gráfico 9 - Estado 3 da respiração (S3) no tecido hepático (lobo isquêmico)

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT p= 0,682

SAL - CONT p= 0,037

SAL - DIAZ p= 0,019

Gráfico 10 - Razão do controle respiratório (RCR) no tecido hepático (lobo isquêmico)
Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6
Tukey não paramétrico
DIAZ - CONT $p= 0,007$
SAL - CONT $p= 0$
SAL - DIAZ $p= 0$

Gráfico 11 - ADP/consumo de oxigênio (ADP/O) no tecido hepático (lobo isquêmico). Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6
 Tukey não paramétrico
 DIAZ - CONT $p= 1$
 SAL - CONT $p= 0$
 SAL - DIAZ $p= 0$

Gráfico 12 - Estado 4 da respiração (S4) no tecido hepático (lobo isquêmico) 4 horas após a reperfusão.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p = 0,258$

SAL - CONT $p = 1$

SAL - DIAZ $p = 0,657$

4.4.2 Função mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não observamos diferença estatisticamente significativa na avaliação do S3, S4, RCR e ADP/O nos animais dos três grupos estudados.

4.5 Nitrito-Nitrato

Quatro horas após a reperfusão, observamos redução significativa nos níveis séricos de Nitrito-Nitrato nos animais tratados com diazóxido quando comparados com os animais do grupo salina. Os animais do grupo diazóxido não apresentaram diferenças significantes quando comparados aos animais do grupo-controle.

Gráfico 13 - Nitrito-Nitrato no soro.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 10.

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p = 0,753$

SAL - CONT $p = 0$

SAL - DIAZ $p = 0,029$

4.6 Mediadores inflamatórios

4.6.1 TNF- α , IL-6 e IL-10

Quatro horas após a reperfusão, observamos redução significativa nos níveis séricos de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos animais tratados com diazóxido quando comparados com os animais do grupo salina (Anexos L, M e N). Os animais do grupo diazóxido não apresentaram diferenças significantes quando comparados aos animais do grupo-controle em relação a estas citocinas estudadas.

Gráfico 14 - TNF- α no soro.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p=0,659$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0$

Gráfico 15 - IL-6 no soro.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p= 0,151$

SAL - CONT $p= 0$

SAL - DIAZ $p= 0,001$

Gráfico 16 - IL-10 no soro.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 6

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p= 0,003$

SAL - CONT $p= 0$

SAL - DIAZ $p= 0$

4.7 Permeabilidade vascular pulmonar

Os resultados da permeabilidade vascular pulmonar foram avaliados pela determinação da concentração do azul de Evans no tecido pulmonar.

Não observamos diferença estatisticamente significativa na concentração do azul de Evans no tecido pulmonar nos animais dos três grupos estudados (Anexo O).

Gráfico 17 - Azul de Evans no tecido pulmonar.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 10

Kruskal-Wallis $p = 0,601$

4.8 Atividade da mieloperoxidase pulmonar

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos resultados da atividade da mieloperoxidase pulmonar entre os três grupos de animais estudados (Anexo P).

Gráfico 18 - Mieloperoxidase no tecido pulmonar.

Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 10

Kruskal-Wallis $p= 0,295$

4.9 Análise histológica do fígado

A graduação global da lesão histológica de I/R dos lobos isquêmicos dos grupos salina e diazóxido foi significativamente maior do que a do grupo-controle, que não sofreu isquemia. Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos de animais que foram submetidos à lesão de I/R em 4 e em 24 após a reperusão.

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre a graduação global da lesão histológica de I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos entre os três grupos estudados (Anexos Q e R).

Gráfico 19 - Histologia Hepática dos lobos isquêmicos após 4 horas após a reperusão. Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=16

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p=0$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0,957$

Gráfico 20 - Histologia Hepática dos lobos isquêmicos após 24 horas após a reperusão. Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 10
 Tukey não paramétrico
 DIAZ - CONT $p= 0,001$
 SAL - CONT $p= 0$
 SAL - DIAZ $p= 0,998$

4.10 Graduação da lesão histológica dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não observamos diferença estatisticamente significante da graduação global da lesão histológica de I/R entre os lobos não isquêmicos comparando os animais tratados com diazóxido com os animais do grupo salina 4 e 24 horas da reperusão.

Gráfico 21 - Histologia Hepática dos lobos não isquêmicos após 4 horas após a reperfusão. Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N= 16

Tukey não paramétrico

DIAZ - CONT $p=0$

SAL - CONT $p=0$

SAL - DIAZ $p=0,748$

Gráfico 22 - Histologia Hepática dos lobos não isquêmicos após 24 horas após a reperfusão. Grupos de animais-controle (CONTR), e submetidos a I/R: SAL (salina) e DIAZ (tratamento com diazóxido). Resultados expressos em mediana, mostrando os valores mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e máximo. N=10
Tukey não paramétrico
DIAZ - CONT $p=0,003$
SAL - CONT $p=0$
SAL - DIAZ $p=0,989$

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

As lesões de isquemia/reperfusão (I/R) hepáticas constituem um problema presente não só nos transplantes de fígado como, também, nas ressecções hepáticas, podendo comprometer o resultado final destas intervenções. Do ponto de vista experimental, o modelo usado no presente trabalho é o mais frequentemente utilizado para avaliar o efeito de diferentes estratégias para redução das lesões de I/R hepática. Este modelo envolve a interrupção do fluxo sanguíneo de parte do órgão preservando, assim, o fluxo sanguíneo de parte do parênquima hepático evitando estase venosa intestinal, que poderia alterar os resultados dos experimentos. Este modelo foi utilizado em vários trabalhos anteriores de nosso grupo.^{26,27,39}

Atualmente, a estratégia mais frequentemente utilizada em clínica para a redução das lesões de I/R em vários órgãos é o pré-condicionamento isquêmico, que consiste na indução de curto período de isquemia hepática seguido de reperfusão antes do início da isquemia prolongada.

Como vimos anteriormente, o mecanismo pelo qual o pré-condicionamento isquêmico reduz as lesões de I/R envolve a ativação do canal mitocondrial de potássio sensível a ATP (mitoKATP). O canal mitocondrial sensível a ATP (mitoKATP) descoberto inicialmente no músculo cardíaco foi, posteriormente, encontrado em outros órgãos, como o cérebro, e músculo esquelético, e, recentemente, no fígado^{49-52,63}. A função fundamental deste canal é permitir o transporte de potássio para o interior da

matrix mitocondrial de modo a manter a homeostase da organela⁵³. Aumentos sutis na concentração de EROs decorrentes de períodos curtos de isquemia/reperfusão na mitocôndria seriam responsáveis pela ativação do mitoKATP.²⁹⁻³⁰

A utilização de drogas capazes de ativar os canais mitocondriais de potássio e, paralelamente, bloquear o influxo de cálcio constitui, teoricamente, mecanismo capaz de proteger o fígado das lesões de I/R. O diazóxido é agonista dos canais de potássio, portanto, pode ter ação semelhante ao pré-condicionamento isquêmico. Com efeito, trabalhos anteriores demonstraram efeito protetor do diazóxido nas lesões de I/R no coração.^{54,55} No presente estudo, observamos uma redução significativa dos níveis séricos de transaminases no grupo de animais submetidos à isquemia hepática que receberam diazóxido quando comparados aos animais que receberam solução salina tanto no período de 4 horas (Gráficos 1 e 2) como tardiamente (Gráficos 3 e 4), comprovando o efeito protetor da droga nestas situações. Como vimos anteriormente, com a reoxigenação, ocorre oxidação da hipoxantina acumulada no citosol celular resultante da degradação do ATP e consequente liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os níveis de peroxidação lipídica refletem, indiretamente, a elevação de EROs. Não conseguimos, no entanto, comprovar uma redução estatisticamente significativa da peroxidação lipídica, que poderia indicar uma ação protetora mitocondrial no grupo de animais que receberam diazóxido (Gráficos 7 e 8). De outro lado, a determinação dos níveis de nitrito/nitrato no soro que avalia a produção de NO demonstrou redução significativa dos níveis destes

compostos nos animais que receberam diazóxido, caracterizando um dos mecanismos de proteção hepática induzido pela droga (Gráfico 13).

A ação protetora do diazóxido sobre as mitocôndrias pode também ser comprovada pelo estudo das funções mitocondriais.

Assim, na avaliação dos diversos parâmetros da função mitocondrial S3, RCR e ADP/O nos animais do grupo diazóxido, observou-se nítida melhora das funções mitocondriais nestes animais quando comparados aos do grupo salina (Gráficos 9 a 11). Não foram encontradas diferenças significantes dos níveis de S4 entre os grupos salina e diazóxido, porém os achados acima refletem melhoria nítida das funções mitocondriais no grupo de animais tratados com diazóxido. Esta melhor preservação da função mitocondrial, portanto, menor dano tecidual, se refletiu em redução dos níveis séricos de transaminases observados nos animais que receberam diazóxido.

A ação do diazóxido se faz por meio de ação agonista sobre o canal mitocondrial de potássio sensível a ATP (mitoKATP). Esta ação limita a lesão isquêmica, como comprovado em vários estudos experimentais relacionados a lesões isquêmicas de miocárdio.⁵⁶⁻⁵⁸ Ocorre, simultaneamente, redução do influxo celular de cálcio (Ca^{++}), o que contribui para reduzir ainda mais a lesão celular na situação de I/R.⁵⁸ Além destas ações, o diazóxido reduz a apoptose por meio do aumento da relação Bcl-2/Bax. Este efeito é bloqueado pela administração de 5-hidroxidecanoato, um conhecido bloqueador dos canais de potássio (mitoKATP).⁵⁹ A droga acima anula o efeito pré-condicionador do diazóxido sugerindo fortemente

que a ação primária do diazóxido se faça sobre os canais de potássio.⁶⁰ No presente estudo, não avaliamos a relação Bcl-2/Bax. Trabalho recente avaliando o efeito do diazóxido nas lesões de I/R demonstrou que a ação do diazóxido também se faz com a suprarregulação da heme oxigenase-1(HO-1).⁶¹ Estes efeitos do diazóxido, no entanto, não se traduziram em redução das alterações histológicas pelo método utilizado no presente estudo para sua avaliação.⁴⁸

No presente estudo, observamos redução drástica dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (Gráficos 14 e 15) no grupo de animais que receberam diazóxido provavelmente relacionada à redução das lesões hepáticas decorrentes do processo de I/R. A redução dos níveis séricos de IL-10, considerada citocina anti-inflamatória, verificada no presente estudo (Gráfico 16), foi, também, observada em trabalhos anteriores nos quais se induziu redução drásticas dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias.⁶² Estes dados sugerem que a elevação dos níveis séricos de IL-10 sejam decorrentes da elevação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, do mesmo modo que sua redução seja reflexo da redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Tomadas em conjunto, as reduções dos níveis séricos de citocinas nos animais que receberam diazóxido refletem a redução da resposta inflamatória hepática em função da menor intensidade da lesão hepática decorrente do processo de I/R, confirmada pela redução dos níveis séricos de transaminases e pela redução das alterações da função mitocondrial.

Não observamos, no entanto, alterações dos níveis séricos de creatinina com a administração de diazóxido tanto precocemente como tardiamente (Gráficos 5 e 6). Não observamos, do mesmo modo, alterações na permeabilidade vascular pulmonar e na determinação da atividade de MPO no tecido pulmonar nos animais que receberam diazóxido quando comparados com os animais que receberam solução salina (Gráficos 19 e 20). Estes dados sugerem que, apesar da redução das lesões hepáticas nos animais que receberam diazóxido, as lesões sistêmicas avaliadas com a determinação dos níveis séricos de creatinina, do estudo da permeabilidade vascular pulmonar e da determinação de MPO não foram minimizadas pela administração de diazóxido. Em trabalho anterior de nosso laboratório, observamos que a administração de solução salina hipertônica nas situações de lesões hepáticas de I/R, embora tenha reduzido as lesões hepáticas, também não induziu alterações da MPO pulmonar, embora houvesse redução das alterações da permeabilidade vascular pulmonar.²⁶ É, portanto, possível que a administração de soluções salinas hipertônicas possam agir não só no fígado, mas, diretamente, em outros órgãos, enquanto o diazóxido agiria predominantemente no órgão isquêmico e, indiretamente, em outros órgãos com a redução das lesões hepáticas. É ainda razoável pensar que a ação sistêmica do diazóxido se faça sentir, mais nitidamente, nas lesões hepáticas mais graves, o que será objeto de futuras investigações.

A redução da pressão venosa central associada ou não à isquemia parcial do órgão é ferramenta utilizada de rotina nas ressecções hepáticas com a finalidade de reduzir o sangramento.

O diazóxido é uma droga que, além da ação de ativar os canais de potássio mitocondriais (mitoKATP), oferecendo proteção hepática, pode reduzir a pressão arterial e venosa, e, conseqüentemente, o sangramento durante as ressecções hepáticas. Para atingir esta finalidade, são utilizadas, atualmente, drogas vasoativas que poderiam com vantagens serem substituídas por diazóxido.

De outro lado, a observação recente de que a administração de diazóxido pode intensificar o processo de regeneração hepática reforça a possibilidade de utilizá-lo nas ressecções hepáticas extensas.⁶³

Estas propriedades do diazóxido, por si só, justificariam um estudo clínico controlado nas grandes ressecções hepáticas e nas situações em que uma isquemia prolongada do órgão se faça necessária.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A administração de diazóxido reduziu as lesões de isquemia/reperfusão hepáticas preservando as funções mitocondriais e reduzindo os níveis séricos de citocinas, podendo ser droga útil nas situações clínicas em que períodos de isquemia hepática fazem parte integrante do procedimento.

7 ANEXOS

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

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	202	4060	880
2	312	1437	3570
3	135	3280	2370
4	380	3563	1195
5	160	3654	3347
6	140	1377	588
7	320	2684	3102
8	203	2295	2645
9	261	3159	1828
10	224	3060	2097
11	161	6040	2783
12	253	3397	820
13	NA	7620	396
14	NA	5900	1560
15	NA	2580	1900
16	NA	2260	3057
Média	229,25	3522,88	2008,62
Desvio Padrão	78,13	1696,13	1028,91
Erro Padrão	22,55	424,03	257,23
Mediana	213,5	3219,5	1998,5
Desvio Interquartilico	113	1246,75	1735,25

Anexo B - Valores séricos de ALT em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	64	3000	660
2	106	1199	3670
3	54	2731	2030
4	100	2481	1080
5	80	3744	3231
6	40	1415	256
7	74	3547	3099
8	54	2155	2174
9	101	2421	1325
10	53	2380	2010
11	66	4870	2391
12	52	3119	920
13	NA	5220	90
14	NA	5460	580
15	NA	7320	1540
16	NA	2000	3646
Média	70,33	3316,38	1793,88
Desvio Padrão	22,05	1651,99	1180,6
Erro Padrão	6,37	413	295,15
Mediana	65	2865,5	1775
Desvio Interquartilico	31,25	1701,75	1713

Anexo C - Valores séricos de AST em 24 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	121	1852	835
2	111	1691	886
3	154	667	317
4	285	1832	417
5	354	391	380
6	99	218	364
7	NA	522	662
8	NA	1057	651
9	NA	852	155
10	NA	701	284
Média	187,33	978,3	495,1
Desvio Padrão	106,26	608,02	246,98
Erro Padrão	43,38	192,27	78,1
Mediana	137,5	776,5	398,5
Desvio Interquartilico	138,75	974,25	330,5

Anexo D - Valores séricos de ALT em 24 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	46	1380	525
2	64	1631	716
3	52	321	233
4	112	1592	285
5	83	255	232
6	47	126	259
7	NA	280	416
8	NA	712	429
9	NA	513	90
10	NA	608	164
Média	67,33	741,8	334,9
Desvio Padrão	25,9	577,2	187,15
Erro Padrão	10,58	182,53	59,18
Mediana	58	560,5	272
Desvio Interquartilico	30	922,75	193,5

Anexo E - Valores séricos de Creatinina em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	0,4	1,5	0,4
2	0,6	0,6	1,0
3	0,4	1,0	2,0
4	0,8	1,7	1,5
5	0,5	1,3	1,9
6	0,5	1,6	1,5
7	0,3	1,1	1,3
8	0,3	1,0	1,3
9	0,4	0,4	0,3
10	0,4	0,5	0,3
11	0,2	0,4	0,4
12	0,4	0,4	0,4
13	NA	0,8	0,4
14	NA	0,5	0,4
15	NA	0,4	0,3
16	NA	0,3	0,3
Média	0,43	0,84	0,86
Desvio Padrão	0,16	0,48	0,63
Erro Padrão	0,04	0,12	0,16
Mediana	0,4	0,7	0,4
Desvio Interquartilico	0,12	0,75	0,98

Anexo F - Valores séricos de Creatinina em 24 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	0,3	1,1	1,1
2	0,3	1,4	1,6
3	0,4	1,5	1,2
4	0,4	1,7	1,1
5	0,4	1,2	1,2
6	0,3	1,0	1,3
7	NA	1,1	0,3
8	NA	0,2	0,3
9	NA	0,4	0,3
10	NA	0,2	0,3
Média	0,35	0,98	0,87
Desvio Padrão	0,05	0,54	0,51
Erro Padrão	0,02	0,17	0,16
Mediana	0,35	1,1	1,1
Desvio Interquartilico	0,1	0,8	0,9

Anexo G - Valores TBARS (Peroxidação Lipídica) em 4 horas nos Lobos Isquêmicos após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL Isq	DIAZ Isq	SAL N Isq	DIAZ N Isq
1	3,30	3,10	3,50	2,10	1,30
2	3,10	3,50	1,95	2,50	1,40
3	2,60	1,60	2,30	1,90	1,60
4	1,70	2,10	2,80	2,70	2,70
5	3,30	4,20	1,20	4,30	0,94
6	1,50	3,20	2,80	2,80	2,00
7	NA	2,10	2,80	2,50	2,70
8	NA	3,90	1,92	2,30	2,40
9	NA	3,00	1,70	2,50	1,90
10	NA	4,10	2,00	4,55	3,10
Média	2,58	3,08	2,3	2,82	2
Desvio Padrão	0,81	0,9	0,68	0,89	0,71
Erro Padrão	0,33	0,28	0,21	0,28	0,22
Mediana	2,85	3,15	2,15	2,5	1,95
Desvio Interquartilico	1,32	1,47	0,87	0,42	1,18

Anexo H – Função mitocondrial: valor estado 3 da respiração mitocondrial (S3) em 4 horas nos lobos isquêmicos e não isquêmicos após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL Isq	DIAZ Isq	SAL N Isq	DIAZ N Isq
1	48,86	30,34	98,88	126,22	62,74
2	53,98	55,97	24,16	126,63	40,29
3	59,44	17,57	107,26	13,80	104,40
4	59,70	14,46	65,56	33,79	52,77
5	55,51	46,76	51,80	65,56	48,71
6	46,88	13,97	57,19	11,80	44,30
Média	54,06	29,84	67,47	62,97	58,87
Desvio Padrão	5,32	17,93	30,99	52,82	23,6
Erro Padrão	2,17	7,32	12,65	21,56	9,64
Mediana	54,74	23,95	61,38	49,67	50,74
Desvio Interquartilico	8,32	27,42	37,4	92,26	14,85

Anexo I – Função mitocondrial: valor da razão do controle respiratório (RCR) em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ	SAL N Isq	DIAZ N Isq
1	3,47	1,23	3,04	3,69	2,58
2	3,87	2,73	2,67	3,47	2,43
3	3,69	1,56	3,23	1,10	3,05
4	3,47	1,43	3,14	2,67	2,40
5	3,71	2,59	3,00	2,00	2,54
6	3,50	2,26	3,52	1,75	3,35
Média	3,62	1,97	3,1	2,45	2,73
Desvio Padrão	0,16	0,64	0,28	1,01	0,39
Erro Padrão	0,07	0,26	0,11	0,41	0,16
Mediana	3,59	1,91	3,09	2,34	2,56
Desvio Interquartilico	0,23	1,04	0,2	1,46	0,47

Anexo J – Função mitocondrial: valor ADP/consumo de oxigênio em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL Isq	DIAZ Isq	SAL N Isq	DIAZ N ISq
1	1,97	1,58	1,97	1,97	1,97
2	1,89	1,82	1,97	1,97	1,86
3	1,89	1,51	1,94	1,51	1,82
4	1,97	1,27	1,97	1,58	1,97
5	1,97	1,89	1,87	1,86	1,87
6	1,97	1,87	1,97	1,67	1,97
Média	1,94	1,66	1,95	1,76	1,91
Desvio Padrão	0,04	0,25	0,04	0,2	0,07
Erro Padrão	0,02	0,1	0,02	0,08	0,03
Mediana	1,97	1,7	1,97	1,77	1,92
Desvio Interquartilico	0,06	0,33	0,02	0,34	0,11

Anexo K – Função mitocondrial: valor estado 4 (S4) da respiração mitocondrial (S3) em 4 horas nos lobos isquêmicos após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL Isq	DIAZ Isq	SAL N Isq	DIAZ N ISq
1	14,09	24,65	32,49	34,25	24,36
2	13,93	20,52	9,06	36,41	16,59
3	16,16	11,29	33,20	12,55	34,20
4	17,22	10,12	20,90	12,67	21,99
5	14,97	18,05	17,27	20,90	19,19
6	13,39	6,18	16,23	6,75	13,97
Média	14,96	15,13	21,53	20,59	21,72
Desvio Padrão	1,47	7,04	9,58	12,3	7,15
Erro Padrão	0,6	2,88	3,91	5,02	2,92
Mediana	14,53	14,67	19,09	16,79	20,59
Desvio Interquartilico	1,89	9,49	13,1	18,33	6,53

Anexo L - Valores séricos de TNF- α em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	10	214	12
2	10	103	0
3	0	335	0
4	0	51	27
5	0	64	0
6	0	146	60
Média	3,33	152,17	16,5
Desvio Padrão	5,16	107,44	23,83
Erro Padrão	2,11	43,86	9,73
Mediana	0	124,5	6
Desvio Interquartilico	7,5	123,25	23,25

Anexo M - Valores séricos de IL-6 em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	66	160	83
2	0	187	65
3	34	687	133
4	0	402	0
5	0	120	41
6	0	130	50
Média	16,67	281	62
Desvio Padrão	27,73	224,36	44,54
Erro Padrão	11,32	91,59	18,18
Mediana	0	173,5	57,5
Desvio Interquartilico	25,5	210,75	35,25

Anexo N - Valores séricos de IL-10 em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	0	67	47
2	38	66	42
3	0	109	33
4	0	87	39
5	33	94	38
6	37	44	39
Média	18	77,83	39,67
Desvio Padrão	19,79	23,32	4,63
Erro Padrão	8,08	9,52	1,89
Mediana	16,5	77	39
Desvio Interquartílico	36	26	3

Anexo O – Permeabilidade vascular pulmonar: azul de Evans no tecido pulmonar em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	118,43	142,67	407,94
2	65,08	578,82	341,67
3	136,13	27,16	60,47
4	52,85	74,23	249,55
5	134,97	63,64	139,80
6	177,32	37,00	36,15
7	NA	258,45	31,62
8	NA	345,00	36,69
9	NA	267,90	189,47
10	NA	205,31	63,57
Média	114,13	200,02	155,69
Desvio Padrão	47,1	172,15	137,36
Erro Padrão	19,23	54,44	43,44
Mediana	126,7	173,99	101,69
Desvio Interquartilico	57,42	199,25	191,9

Anexo P – Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL	DIAZ
1	0,040	0,064	0,034
2	0,028	0,034	0,037
3	0,026	0,044	0,030
4	0,051	0,062	0,059
5	0,068	0,060	0,070
6	0,041	0,062	0,047
7	NA	0,106	0,080
8	NA	0,100	0,120
9	NA	0,037	0,140
10	NA	0,050	0,034
Média	0,04	0,06	0,07
Desvio Padrão	0,02	0,02	0,04
Erro Padrão	0,01	0,01	0,01
Mediana	0,04	0,06	0,05
Desvio Interquartilico	0,02	0,02	0,04

Anexo Q – Histologia hepática: Escore de Quireze nos lobos isquêmicos e não isquêmicos em 4 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL Isq	DIAZ Isq	SAL N Isq	DIAZ N Isq
1	1	12	1	1	1
2	0	0	10	3	1
3	0	5	5	2	1
4	0	10	6	0	3
5	0	5	7	1	1
6	0	7	2	0	1
7	2	3	8	0	2
8	1	5	7	2	1
9	0	6	6	2	1
10	2	9	8	2	0
11	1	12	3	1	0
12	2	10	3	2	0
13	0	2	7	1	2
14	1	2	5	2	1
15	1	2	1	0	1
16	0	8	8	2	2
Média	0,69	6,12	5,44	1,31	1,12
Desvio Padrão	0,79	3,77	2,73	0,95	0,81
Erro Padrão	0,2	0,94	0,68	0,24	0,2
Mediana	0,5	5,5	6	1,5	1
Desvio Interquartilico	1	6,5	4,25	1,25	0,25

Anexo R – Histologia hepática: Escore de Quireze nos lobos isquêmicos e não isquêmicos em 24 horas após a reperfusão.

Rato	CONT	SAL Isq	DIAZ Isq	SAL N Isq	DIAZ N Isq
1	1	6	8	1	1
2	3	11	9	0	1
3	0	4	11	5	0
4	0	6	6	2	1
5	0	6	9	4	0
6	0	7	12	1	1
7	NA	5	2	1	0
8	NA	12	5	0	1
9	NA	9	0	0	1
10	NA	7	8	1	0
Média	0,67	7,3	7	1,5	0,6
Desvio Padrão	1,21	2,58	3,8	1,72	0,52
Erro Padrão	0,49	0,82	1,2	0,54	0,16
Mediana	0	6,5	8	1	1
Desvio Interquartilico	0,75	2,5	3,75	1,5	1

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg.* 1975;129(5):513-7.
2. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001;181:160-6.
3. Moussa ME, Sarraf CE, Uemoto S, Sawada H, Habib NA. Effect of total hepatic vascular exclusion during liver resection on hepatic ultrastructure. *Liver Transpl Surg.* 1996;2(6):461-7.
4. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz H, Lienhart A, Huguet C. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg.* 1989;209:211-8.
5. Powner DJ. Factors during donor care that may affect liver transplantation outcome. *Prog Transplant.* 2004;14:241-9.
6. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1998;5(4):402-8.
7. Hirsch J, Niemann CU, Hansen KC, Choi S, Su X, Frank AJ, Fang X, Hirose R, Theodore P, Sapru A, Burlingame AL, Matthay MA. Alterations in the proteome of pulmonary alveolar type II cells in the rat after hepatic ischemia-reperfusion. *Crit Care Med.* 2008;36(6):1846-54.
8. Arab AH, Sasani F, Rafiee MH, Fatemi A, Javaheri A. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *World J Gastroenterol.* 2009;15(16):1951-7.
9. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2008;147(1):153-9.

10. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia- reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg.* 1991;213(2):137-42.
11. Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS. Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia- reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2005;11(6):663-8.
12. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89:1269-1339.
13. Muller MJ, Vollmar B, Friedl HP, Menger MD. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(2):189-97.
14. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc.* 1987;46:2402-6.
15. Lentsch AB, Atsushi K, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000;32:169-73.
16. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroent Hepatol.* 2003;18:891-902.
17. Shiratori Y, Kiriyaama H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, Kamii K. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci.* 1994;39:1265-72.
18. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery.* 1995;117:195-200.
19. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb J.* 1990;4(15):3355-9.

20. Lemasters JJV. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276:G1-6.
21. Clarke CN, Kuboki S, Tevar A, Lentsch AB, Edwards M. CXC chemokines play a critical role in liver injury, recovery, and regeneration. *Am J Surg.* 2009;198:415-9.
22. Abdo EE, Cunha JEM, Deluca P, Coelho AMM, Bacchella T, Machado MCC. Protective effect of N2-mercaptpropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process. *Arq Gastroenterol.* 2003;40(3):177-80.
23. Isozaki H, Adam R, 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(4):310-3.
24. Mueller AR, Platz KP, Schumacher G, Riger J, Gebauer B, Neumann U, Neuhaus P. Mechanisms of preservation and reperfusion injury in human liver transplantation. *Transplant Proc.* 1997;29(8):3455-7.
25. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia- reperfusion injury: a review. *Liver Transpl.* 2005;11(9):1031-47.
26. Figueira ERR, Bachella T, Coelho AMM, Sampietre SN, Molan NAT, Leitão RMC, Machado MCC. Timing-dependent protection of hypertonic saline solution administration in experimental liver ischemia/reperfusion injury. *Surgery.* 2010;147(3):415-23.
27. Coelho AM, Machado MC, Takahashi HK, Sampietre SN, Stefano JT, Leite AZ, Curi R, D'Albuquerque LA. Ischemic preconditioning-like effect of polyunsaturated fatty acid-rich diet on hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Gastrointest Surg.* 2011;15(10):1679-88.
28. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(7-8):946-52.

29. Zhang WX, Yin W, Zhang L, Wang LH, Bao L, Tuo HF, Zhou LF, Wang CC. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009;8(6):586-90.
30. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(29):18092-8.
31. Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(2):202-12.
32. Schwartz LM, Reimer KA, Crago MS, Jennings RB. Pharmacological preconditioning with diazoxide slows energy metabolism during sustained ischemia. *Exp Clin Cardiol.* 2007;12(3):139-47.
33. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* 1996;271(15):8796-9.
34. Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(7):1039-48.
35. Domoki F, Bari F, Kis B, Nagy K, Busija DW, Siklós L. Diazoxide prevents mitochondrial swelling and Ca²⁺ accumulation in CA1 pyramidal cells after cerebral ischemia in newborn pigs. *Brain Res.* 2004;1019:97-104.
36. Rahgozar M, Willgoss DA, Gobé GC, Endre ZH. ATP-dependent K⁺ channels in renal ischemia reperfusion injury. *Ren Fail.* 2003;25(6):885-96.
37. O'Sullivan JC, Fu D, Alam HB, McCabe JT. Diazoxide Increases Liver and Kidney HSP25 and HSP70 after shock and stroke. *J Surg Res.* 2008;149:120-30.

38. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg*. 1998;85(12):1636-40.
39. Canedo LF, Machado MA, Coelho AM, Sampietre SN, Bacchella T, Machado M. Protective effects of an inhibitor of glycoprotein IIb/IIIa in the hepatic and pulmonary disturbances secondary to ischemia and reperfusion injury of rat's liver. *Arq Gastroenterol*. 2007;44(3):276-81.
40. Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1- deficient mice. *Shock*. 2002;17(4):286-92.
41. Coelho AM, Machado MC, Sampietre SN, Leite KR, Oliveira VL, Pinotti HW. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(8):947-53.
42. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. In: Estabrook RW & Pullman ME, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press. 1967:41-7.
43. Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*. 1955;175:1120-1.
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
45. Jancar S, De Giaccobi G, Mariano M, Mencia-Huerta JM, Sirois P, Braquet P. Immune complex induced pancreatitis: effect of BN 52021, a selective antagonist of platelet-activating factor. *Prostaglandins*. 1988;35:757-70.
46. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985;59(6):1978-85.
47. Warren JS, Yabroff KR, Mandel DM, Johnson KJ, Ward PA. Role of O₂-in the neutrophil recruitment into site of dermal and pulmonary vasculitis. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(2):163-72.

48. Quireze C, Montero EF, Leitaó RM, Juliano Y, Fagundes DJ, Poli-de-Figueiredo LF. Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Invest Surg.* 2006;19(4):229-36.
49. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* 1983;305:147-8.
50. Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem.* 2001;276:33369-74.
51. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* 1991;352:244-7.
52. Debska G, Kicinska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS. Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1556:97-105.
53. Kicińska A, Szewczyk A. Protective effects of the potassium channel opener- diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen Physiol Biophys.* 2003;22(3):383-95.
54. Wakahara N, Katoh H, Yaguchi Y, Uehara A, Satoh H, Terada H, Fujise Y, Hayashi H. Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts. *Circ J.* 2004;68(2):156-62.
55. Lenzsér G, Kis B, Bari F, Busija DW. Diazoxide preconditioning attenuates global cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 2005;1051:72-80.
56. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 1997;81(6):1072-82.

-
57. Hale SL, Kloner RA Effect of combined K(ATP) channel activation and Na(+)/H(+) exchange inhibition on infarct size in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2673-7.
 58. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marbán E. 14.Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. 2001;89(10):891-8.
 59. Liu RG, Wang WJ, Song N, Chen YQ, Li LH.Diazoxide preconditioning alleviates apoptosis of hippocampal neurons induced by anoxia-reoxygenation in vitro through up-regulation of Bcl-2/Bax protein ratio. *Sheng Li Xue Bao*. 2006;25;58(4):345-50.
 60. Guo W, Ge D, Wang Q, Xu S, Xue L, Lu C, Tan L. Diazoxide decreases ischemia-reperfusion injury in a rat model of lung transplantation. *Transplant Proc*. 2011;43(7):2510-6.
 61. Zeng Z, Huang HF, He F, Wu LX, Lin J, Chen MQ. Diazoxide attenuates ischemia/reperfusion injury via upregulation of heme oxygenase-1 after liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol*. 2012;18(15):1765-72.
 62. Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, Sampietre SN, Soriano F, Matheus AS, Patzina RA, Cunha JE, Velasco IT. Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006;32(1):80-6.
 63. Nakagawa Y, Yoshioka M, Abe Y, Uchinami H, Ohba T, Ono K, Yamamoto Y. Enhancement of liver regeneration by adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel opener (diazoxide) after partial hepatectomy. *Transplantation*. 2012;93(11):1094-100.
 64. Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*. 2nd Edition. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey; 2005.
 65. Brunner E, Puri ML. Nonparametric methods in factorial designs. *Statistical Papers*. 2001;42:1-52.