FERNANDA PAULA CAVALCANTE

Efeitos do sevoflurano administrado como pré-condicionante ou de modo contínuo nas lesões locais e sistêmicas da isquemia/reperfusão hepática. Estudo experimental em ratos.

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

Programa de: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eleazar Chaib

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cavalcante, Fernanda Paula

Efeitos do sevoflurano administrado como pré-condicionante ou de modo contínuo nas lesões locais e sistêmicas da isquemia/reperfusão hepática. Estudo experimental em ratos / Fernanda Paula Cavalcante. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Eleazar Chaib.

Descritores: 1.Sevoflurano 2.Figado 3.Traumatismo por reperfusão
4.Pulmão 5.Rim 6.Citocinas 7.Anestésicos inalatórios 8.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-434/13

Dedico esta tese a minha amada família, em especial:

À minha mãe Fátima, por sua dedicação e amor incondicionais. Por seu caráter irrepreensível e por ter me ensinado que a idoneidade moral é a maior das virtudes. Mãe, tudo que fui, sou e serei devo a você.

Ao meu esposo Matheus, por sempre apoiar meus sonhos, mesmo que eles estivessem a milhares de quilômetros de distância. Pelo amor e companheirismo ao longo de mais de 15 anos e por me dar meu maior presente, nossa pequena Letícia.

Ao Prof. Marcel Machado, meu querido tio Marcel, minha grande referência como médico e pesquisador, e meu maior incentivador profissional. Por guiar meus passos desde a infância, por me estimular a estudar e aprender diariamente, e por tudo que fez e continua fazendo por mim e pela minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, por acreditar no meu trabalho e disponibilizar toda a estrutura do LIM/37 para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eleazar Chaib, pela paciência e atenção com que sempre me atendeu e por aceitar o desafio de ser meu orientador.

Ao estatístico Márcio Augusto Diniz, pela preciosa contribuição na análise estatística deste trabalho e por sempre atender prontamente minhas solicitações.

À patologista Dra. Rosely Antunes Patzina, pela dedicação e pelo excelente trabalho desempenhado na leitura das lâminas histológicas.

A todos os funcionários do LIM/37, especialmente, a Genilton, Dona Maria, Paulo Fister, Sérgio Ribeiro e Genivaldo ("Zu"), por estarem sempre dispostos a me ajudar a solucionar os mais diversos problemas encontrados durante esta jornada.

À secretária Vilma de Jesus Libério, pelo profundo conhecimento da estrutura da pós-graduação, por sempre responder aos meus questionamentos e por ajudar a tornar a distância um empecilho menor.

Aos amigos anesthesiologistas, Dr. Joel Avancini Rocha Filho e Dr. Ricardo Souza Nani, por ajudarem a desenvolver o modelo experimental.

Às amigas anesthesiologistas, Profa. Dra. Cláudia Regina Fernandes e Dra. Ruth Pinto Camarão, por todo o apoio, pelo incentivo e pela torcida durante esta jornada.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que tão bem me acolheu, por me ajudar a realizar sonhos de infância ao longo dos últimos 6 anos.

Aos professores, assistentes e funcionários da disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade, pela competência e pelo compromisso com que contribuíram para minha formação durante os anos de residência médica.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, especialmente ao Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia, pelos ensinamentos durante a graduação que serviram de base para que eu chegasse até este momento.

A todos os amigos cearenses que me receberam mensalmente em suas casas ao longo dos últimos 3 anos, especialmente, aos primos Fred e Luciana, por todo carinho e atenção, e por fazerem da sua casa a minha casa em São Paulo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Às amigas Ana Maria de Mendonça Coelho, Sandra Nassa Sampietre e Nilza Aparecida Trindade Molan, que fazem parte da estrutura fundamental do LIM/37, pelo carinho e pela amizade com que me receberam, pelos ensinamentos, pela competência, por trabalharem diuturnamente para o bom andamento da pesquisa e, principalmente, por tornarem possível a realização desta tese.

“Sucesso é o resultado da prática constante de fundamentos e ações vencedoras. Não há nada de milagroso no processo, nem sorte envolvida. Amadores aspiram, profissionais trabalham.”

“A vontade de se preparar tem que ser maior que a vontade de vencer.”

“Temos que perceber que, tão logo finda um confronto, já começa, imediatamente, a preparação para outro.”

Bernardo Rezende (Bernardinho)
Transformando Suor em Ouro, 2006

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta 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 F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas 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 QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVO.....	9
3 MÉTODOS.....	11
3.1 Animais de experimentação.....	11
3.2 Sevoflurano.....	11
3.3 Delineamento experimental	12
3.4 Indução da Isquemia/Reperusão hepática.....	13
3.5 Coleta de materiais para análise.....	16
3.6 Dosagem das transaminases.....	17
3.7 Avaliação das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais	17
3.8 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático	18
3.9 Análise histológica do fígado	18
3.10 Análises teciduais pulmonares.....	21
3.10.1 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar.....	21
3.10.2 Atividade da mieloperoxidase pulmonar	21
3.11 Dosagem dos mediadores inflamatórios	22
3.12 Dosagem de creatinina	22
3.13 Análise estatística	22
4 RESULTADOS	25
4.1 Resultados do pré-condicionamento com sevoflurano	25
4.1.1 Dosagem das transaminases: AST e ALT	25
4.1.2 Avaliação das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais	26
4.1.2.1 Lobos hepáticos isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial.....	26

4.1.2.1.1 Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.....	26
4.1.2.1.2 Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.....	27
4.1.2.1.3 Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos	28
4.1.2.1.4 Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.....	29
4.1.2.2 Lobos hepáticos não isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial.....	30
4.1.2.2.1 Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	30
4.1.2.2.2 Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	31
4.1.2.2.3 Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	32
4.1.2.2.4 Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	33
4.1.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático	34
4.1.3.1 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos isquêmicos	34
4.1.3.2 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	35
4.1.4 Análise histológica do fígado	36
4.1.4.1 Análise histológica dos lobos hepáticos isquêmicos	36
4.1.4.1.1 Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.....	36
4.1.4.1.2 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos	37
4.1.4.2 Análise histológica dos lobos hepáticos não isquêmicos	38
4.1.4.2.1 Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	38
4.1.4.2.2 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos	38
4.1.5 Análises teciduais pulmonares.....	39
4.1.5.1 Permeabilidade vascular pulmonar: azul de Evans	39
4.1.5.2 Atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO).....	40
4.1.6 Mediadores inflamatórios	41
4.1.6.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	41
4.1.6.2 Interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10)	42
4.1.7 Dosagem de Creatinina	44

4.2 Resultados da administração contínua de sevoflurano.....	44
4.2.1 Dosagem das transaminases: AST e ALT	44
4.2.2 Avaliação das funções oxidativas mitocondriais	46
4.2.2.1 Lobos hepáticos isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial.....	46
4.2.2.1.1 <i>Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos</i>	46
4.2.2.1.2 <i>Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos</i>	47
4.2.2.1.3 <i>Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos</i>	47
4.2.2.1.4 <i>Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos</i>	48
4.2.2.2 Lobos hepáticos não isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial.....	49
4.2.2.2.1 <i>Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos</i>	49
4.2.2.2.2 <i>Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos</i>	50
4.2.2.2.3 <i>Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos</i>	51
4.2.2.2.4 <i>Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos</i>	52
4.2.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático	53
4.2.3.1 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos isquêmicos	53
4.2.3.2 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	54
4.2.4 Análise histológica do fígado	55
4.2.4.1 Análise histológica dos lobos hepáticos isquêmicos.....	55
4.2.4.1.1 <i>Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos</i>	55
4.2.4.1.2 <i>Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos</i>	56
4.2.4.2 Análise histológica dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	57
4.2.4.2.1 <i>Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos não isquêmicos</i>	57
4.2.4.3 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	58
4.2.5 Análises teciduais pulmonares.....	58
4.2.5.1 Permeabilidade vascular pulmonar: azul de Evans	58

4.2.5.2 Atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO)	59
4.2.6 Mediadores inflamatórios	60
4.2.6.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	60
4.2.6.2 Interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10)	61
4.2.7 Dosagem de creatinina	63
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÃO.....	72
7 ANEXOS.....	74
ANEXO A - Valores séricos de aspartato aminotransferase (AST).....	74
ANEXO B - Valores séricos de alanina aminotransferase	75
ANEXO C - Valores do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos	76
ANEXO D - Valores do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos	77
ANEXO E - Valores da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos	78
ANEXO F - Valores da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos	79
ANEXO G - Valores do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	80
ANEXO H - Valores do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	81
ANEXO I - Valores da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	82
ANEXO J - Valores da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos	83
ANEXO K - Valores da concentração de malondialdeído (MDA) dos lobos hepáticos isquêmicos	84
ANEXO L - Valores da concentração de malondialdeído (MDA) dos lobos hepáticos não isquêmicos	85
ANEXO M - Valores do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.....	86
ANEXO N - Valores do escore histológico dos lobos hepáticos isquêmicos.....	87
ANEXO O - Valores do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos não isquêmicos.....	88
ANEXO P - Valores do escore histológico dos lobos hepáticos não isquêmicos	89

ANEXO Q - Valores da concentração do corante azul de Evans (AE) no tecido pulmonar	90
ANEXO R - Valores da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO)	91
ANEXO S - Valores séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF-A)	92
ANEXO T - Valores séricos da interleucina 6 (IL-6).....	93
ANEXO U - Valores séricos da interleucina 10 (IL-10)	94
ANEXO V - Valores séricos de creatinina	95
8 REFERÊNCIAS	97

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
CSEs	Células sinusoidais endoteliais
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
SE30	Grupo pré-condicionamento
SECO	Grupo sevoflurano contínuo
SHAM	Grupo controle
STO	Grupo sem tratamento
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
°C	Graus Celsius
Hz	Hertz
µg/mg	Micrograma por miligrama
M	Mol
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	Veze

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fisiopatologia básica da I/R ¹ . ATP: adenosina trifosfato. Na ⁺ /K ⁺ /ATPase: bomba de sódio e potássio dependente de ATP. [Na ⁺]: concentração intracelular do íon sódio. O ₂ : oxigênio. EROs: espécies reativas de oxigênio. [Ca ⁺]: concentração intracelular do íon cálcio.....	4
Figura 2	Representação esquemática do delineamento experimental.	13
Figura 3	Preparação para início da cirurgia. Intubação orotraqueal com Jelco® nº 16. Monitorização da oximetria, frequência respiratória, fração expirada de anestésico inalatório e capnografia. Monitorização da temperatura por termômetro retal digital.	14
Figura 4	Modelo de isquemia hepática parcial. A: disseção e reparo do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral esquerdo. B: pinçamento do pedículo com pinça microvascular atraumática; isquemia hepática parcial dos lobos mediano e lateral esquerdo (acima da pinça), com preservação da perfusão dos lobos caudado e direito (abaixo da pinça).	15
Figura 5	Valores médios ± DP dos níveis séricos de AST.....	25
Figura 6	Valores médios ± DP dos níveis séricos de ALT.	26
Figura 7	Valores médios ± DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	27
Figura 8	Valores médios ± DP do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	28
Figura 9	Valores médios ± DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	29
Figura 10	Valores médios ± DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	30
Figura 11	Valores médios ± DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	31
Figura 12	Valores médios ± DP estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	32
Figura 13	Valores médios ± DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	33

Figura 14	Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	34
Figura 15	Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos isquêmicos.	35
Figura 16	Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos não isquêmicos.	36
Figura 17	Valores médios $\pm$ DP do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.	37
Figura 18	Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos.	38
Figura 19	Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos.	39
Figura 20	Valores médios $\pm$ DP da concentração do corante azul de Evans (AE) no tecido pulmonar.	40
Figura 21	Valores médios $\pm$ DP da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO).	41
Figura 22	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de TNF- α	42
Figura 23	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-6.	43
Figura 24	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-10.	43
Figura 25	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de creatinina.	44
Figura 26	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de AST.	45
Figura 27	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de ALT.	45
Figura 28	Valores médios $\pm$ DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	46
Figura 29	Valores médios $\pm$ DP do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	47
Figura 30	Valores médios $\pm$ DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	48
Figura 31	Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.	49
Figura 32	Valores médios $\pm$ DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	50
Figura 33	Valores médios $\pm$ DP do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	51
Figura 34	Valores médios $\pm$ DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	52

Figura 35	Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.	53
Figura 36	Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos isquêmicos.	54
Figura 37	Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos não isquêmicos.	55
Figura 38	Valores médios $\pm$ DP do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.	56
Figura 39	Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos.	57
Figura 40	Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos.	58
Figura 41	Valores médios $\pm$ DP da concentração do corante azul de Evans (AE) no tecido pulmonar.	59
Figura 42	Valores médios $\pm$ DP da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO).	60
Figura 43	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de TNF- α	61
Figura 44	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-6.....	62
Figura 45	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-10.....	62
Figura 46	Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de creatinina.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Graduação histológica da lesão de I/R hepática adaptada de Quireze <i>et al.</i> ⁵⁶	20
-----------------	--	----

RESUMO

Cavalcante FP. *Efeitos do sevoflurano administrado como pré-condicionante ou de modo contínuo nas lesões locais e sistêmicas da isquemia/reperfusão hepática. Estudo experimental em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Lesões de isquemia/reperfusão hepáticas significativas podem ocorrer durante hepatectomias, no transplante hepático e no trauma hepático. A isquemia/reperfusão hepática pode levar à resposta inflamatória sistêmica associada a lesões locais e a distância. Estudos já demonstraram o efeito protetor do sevoflurano sobre as lesões de isquemia/reperfusão hepáticas; entretanto, nenhuma pesquisa, até o momento, estudou se esta proteção se dá por pré-condicionamento ou se depende da administração contínua do anestésico durante todo o período de isquemia/reperfusão. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do pré-condicionamento com sevoflurano ou da sua administração contínua nas lesões locais e sistêmicas da isquemia/reperfusão hepática em ratos. **MÉTODOS:** Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo SHAM (n=12): animais submetidos à laparotomia mediana sem isquemia hepática; grupo Sem Tratamento (n=13): animais submetidos à isquemia/reperfusão hepática sem administração de sevoflurano; grupo Pré-condicionamento (n=13): sevoflurano foi administrado por 30 minutos e descontinuado antes da isquemia hepática; grupo Sevoflurano Contínuo (n=13): sevoflurano foi administrado por 30 minutos antes da isquemia hepática e também durante todo o período de isquemia/reperfusão. Nos três últimos grupos, ratos machos da linhagem wistar foram submetidos a modelo de isquemia hepática parcial por meio do clampeamento do pedículo hepático comum dos lobos mediano e anterolateral esquerdo. O clampe foi removido após 1 hora de isquemia e as análises realizadas após 4 horas de reperfusão. Em todos os grupos, a indução anestésica foi realizada com cetamina e xilazina, e os ratos foram intubados e submetidos à ventilação mecânica. O sangue foi coletado para dosagens de AST, ALT, TNF- α , IL-6 e IL-10. Os lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos foram separados para estudo das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais, conteúdo de malondialdeído e análise histológica. Também foram avaliadas permeabilidade vascular pulmonar atividade da mieloperoxidase pulmonar. **RESULTADOS:** Após 4 horas de reperfusão, o grupo Sevoflurano Contínuo apresentou elevação dos níveis séricos de AST e ALT significativamente menor que os grupos Pré-condicionamento e Sem Tratamento ($p < 0,05$). No grupo Sevoflurano Contínuo, houve redução significativa da disfunção mitocondrial e incidência de necrose nos lobos hepáticos isquêmicos comparado aos grupos Pré-condicionamento e Sem Tratamento ($p < 0,05$). A permeabilidade vascular pulmonar foi menor no grupo Sevoflurano Contínuo comparado aos grupos

Pré-condicionamento e Sem Tratamento ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças no conteúdo de malondialdeído no tecido hepático, na atividade da mieloperoxidase pulmonar e nos níveis séricos de TNF- α , IL-6 e IL-10 entre os grupos. CONCLUSÃO: O pré-condicionamento com sevoflurano não demonstrou proteção contra as lesões locais e sistêmicas da isquemia/reperfusão hepática. Entretanto, a administração contínua de sevoflurano reduziu ambas as lesões locais, no fígado isquêmico, e a distância, nos pulmões, associadas à isquemia/reperfusão hepática.

Descritores: Sevoflurano; Fígado; Traumatismo por reperfusão; Pulmão; Rim; Citocinas; Anestésicos inalatórios; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Cavalcante FP. *Effects of sevoflurane preconditioning or continuously in local and systemic lesions of hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: Significant liver ischemia/reperfusion injury can occur during hepatectomies, liver transplantation, and liver trauma. Hepatic ischemia/reperfusion can trigger a systemic inflammatory syndrome associated with both local and systemic lesions. Previous studies have shown that sevoflurane protects from liver ischemia/reperfusion injury; however it was not studied yet if this protection is mediated by preconditioning or if it depends on continuous use of the anesthetic during the whole I/R injury period. **AIM:** It was hypothesized that sevoflurane preconditioning or continuously would protect from local and systemic lesions of liver ischemia/reperfusion injury in the rat. **METHODS:** Rats were divided into 4 groups: SHAM Group (n=12): animals were submitted to median laparotomy without liver ischemia; No Treatment Group (n=13): animals were submitted to I/R injury and no sevoflurane was used; Preconditioning Group (n=13): sevoflurane was used during 30 minutes and discontinued before liver ischemia; and Continuous Sevoflurane Group (n=13): sevoflurane was used 30 minutes before liver ischemia and during the whole liver I/R injury time. In the last three groups, wistar male rats underwent partial liver ischemia performed by clamping the hepatic pedicle from medium and left anterior lateral lobules. Clamp was removed after 1 hour of partial ischemia and analysis were performed after 4 hours of reperfusion. In all groups, anesthesia was induced with cetamine and xylazine and rats were intubated and mechanical ventilated. Blood was collected for determinations of AST, ALT, TNF- α , IL-6, and IL-10. Ischemic and non-ischemic liver tissues were assembled for mitochondrial oxidation and phosphorylation, malondialdehyde content, and histological analysis. Pulmonary vascular permeability and myeloperoxidase activity were also determined. **RESULTS:** Four hours after reperfusion Continuous Sevoflurane group had shown elevation of serum AST and ALT levels significantly lower than Preconditioning and No Treatment groups ($p<0.05$). A significant reduction on liver mitochondrial dysfunction and liver necrosis incidence were observed in ischemic liver tissues in Continuous Sevoflurane group compared to Preconditioning and No Treatment groups ($p<0.05$). A reduction on pulmonary vascular permeability was observed in Continuous Sevoflurane group compared to Preconditioning and No Treatment groups ($p<0.05$). No differences in liver malondialdehyde content, pulmonary myeloperoxidase activity, and serum TNF- α , IL-6, and IL-10 levels were observed among these groups. **CONCLUSIONS:** Sevoflurane preconditioning did not show protection against local and systemic lesions associated with liver ischemia/reperfusion

injury. On the other hand, continuous sevoflurane administration reduced both local lesions, in ischemic liver, and systemic lesions, in the lungs, associated with liver ischemia/reperfusion injury.

Descriptors: Sevoflurane; Liver; Reperfusion Injury; Lung; Kidney; Cytokines; Anesthetics, inhalation; Rats, Wistar.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A isquemia/reperfusão (I/R) hepática resulta de isquemia prolongada do órgão seguida pela restauração do seu fluxo sanguíneo^{1,2}. Clinicamente, ela ocorre após clampeamento da tríade portal (veia porta, artéria hepática e vias biliares) seguida de reperfusão. A interrupção do fluxo portal pode ser realizada durante hepatectomias eletivas e no contexto de trauma hepático, para prevenção e controle de sangramentos hepáticos maciços^{1,3}. No transplante hepático, a isquemia se instala após a captação do órgão e é seguida de reperfusão após o implante do fígado no receptor^{1,4}. Situações de hipoperfusão e hipóxia prolongadas, como choque^{1,5}, sepse, insuficiência cardíaca congestiva e falência respiratória^{1,6} também podem desencadear o fenômeno de I/R.

A I/R é uma reação tipicamente inflamatória que envolve a interação de vários fatores humorais e celulares. O dano celular local instala-se tanto durante a fase de isquemia como durante a reperfusão e não se limita ao órgão acometido. No caso da I/R hepática, ocorrem, também, lesões de órgãos a distância, secundárias à resposta inflamatória sistêmica que se desenvolve após uma I/R prolongada. Pulmões^{1,7}, rins^{1,8}, coração^{1,9} e vasos sanguíneos^{1,10}, dentre outros, podem ser afetados.

A compreensão dos mecanismos humorais, celulares e moleculares da resposta inflamatória associada às lesões de I/R hepática é fundamental para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas, capazes de reduzir o dano tecidual hepático e de órgãos a distância, e, conseqüentemente, a morbimortalidade dos pacientes.

Durante o período de isquemia hepática, células de Kupffer (CK), células sinusoidais endoteliais (CSEs) e hepatócitos sofrem com a falta de produção de adenosina trifosfato (ATP)^{1,11}. A falta de ATP ocasiona falência da bomba de sódio e potássio dependente de ATP (Na/K/ATPase) na membrana celular, com conseqüente acúmulo intracelular de sódio (Na⁺),

edema e tumefação celular (Figura 1). O edema das CK e das CSEs, somado ao acúmulo de substâncias vasoconstrictoras, como tromboxano A2 e endotelina, e, ainda, a redução dos níveis de óxido nítrico diminuem a luz dos sinusoides^{1,12}. Durante a reperfusão, há aumento da adesão e agregação de plaquetas e neutrófilos, que acabam por diminuir ainda mais a luz sinusoidal. O resultado é redução significativa do fluxo sanguíneo local pós-reperfusão, inclusive com áreas de obstrução completa ao retorno do fluxo sanguíneo, às quais se dá o nome de áreas de não reperfusão^{1,13}.

As CK são macrófagos encontrados no interior dos hepatócitos que possuem papel fundamental no início e na propagação da morte e lesão celular associadas à I/R^{1,14}. Após sua ativação, que se dá com a produção de complemento pelos hepatócitos, e que ocorre tanto durante a isquemia quanto durante a reperfusão, as CK produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10)^{1,15}. O TNF- α tem papel central na cascata inflamatória da I/R^{1,16}. Ele age de forma parácrina (localmente) e endócrina (a distância), e é um dos principais mediadores responsáveis pelas lesões sistêmicas da I/R hepática^{1,16}.

EROs e citocinas inflamatórias têm papel fundamental na ativação e recrutamento de neutrófilos^{1,15} e linfócitos T CD4+^{1,17} durante a reperfusão. Linfócitos T CD4+ e linfócitos T natural killers agem produzindo interferon- γ (INF- γ), que acaba por ativar mais CK, gerando cascata viciosa de eventos que culmina com lesão e morte celular^{1,18,19}.

Distúrbios da homeostase de cálcio (Ca⁺⁺), sódio (Na⁺) e hidrogênio (H⁺) instalam-se durante o fenômeno de I/R e, quando graves, resultam em morte celular^{1,20}. O aumento da concentração intracelular de Ca⁺⁺, que é estimulado pela ação das EROs, e se dá por meio da entrada do íon no interior do hepatócito e da liberação do Ca⁺⁺ estocado no retículo endoplasmático liso, culmina com o aumento da sua concentração no interior da mitocôndria, contribuindo para a lesão mitocondrial associada à I/R^{1,20} (Figura 1).

Figura 1 – Fisiopatologia básica da I/R¹. ATP: adenosina trifosfato. Na⁺/K⁺/ATPase: bomba de sódio e potássio dependente de ATP. [Na⁺]: concentração intracelular do íon sódio. O₂: oxigênio. EROs: espécies reativas de oxigênio. [Ca⁺]: concentração intracelular do íon cálcio.

O complemento, depois de ativado pela I/R, lesa o hepatócito tanto de forma direta, pela lise das células após a formação dos complexos de ataque à membrana celular, como de forma indireta, com a ativação de neutrófilos e CK^{1,13}. Ele está implicado também nas lesões de órgãos a distância que fazem parte do contexto do fenômeno de I/R^{1,21,22}.

Esta sequência de eventos ocasiona lesão e morte celular nos hepatócitos. Necrose e apoptose acontecem simultaneamente como mecanismos fisiopatológicos de morte hepatocelular na lesão de I/R^{23,24}.

Diversas estratégias foram desenvolvidas nas últimas décadas na tentativa de minimizar a resposta inflamatória local e sistêmica associada aos fenômenos de I/R hepáticos. Dentre elas, destacam-se o pré-condicionamento isquêmico²⁵, manobra de Pringle parcial²⁶, pré-condicionamento farmacológico²⁷⁻³¹ e, mais recentemente, pré-condicionamento anestésico³².

Há muito, se sabe que múltiplos fatores relacionados ao manejo e a técnicas cirúrgicas podem influenciar o prognóstico dos pacientes. Entretanto, estudos recentes demonstram que fatores relacionados às técnicas anestésicas também podem influenciá-lo. Exemplos disso são as evidências de que manejo anestésico que preserve a perfusão tecidual, mantenha oxigenação tissular adequada, evite hipotermia e maximize a analgesia é capaz de diminuir as taxas de infecção de sítio cirúrgico³³. O

controle da hipotermia também reduz o tempo de internação hospitalar, diminui o risco de sangramento perioperatório e a necessidade de transfusão³³. A transfusão de hemoderivados, além dos riscos já conhecidos relacionados a reações transfusionais³⁴, está implicada no aumento da mortalidade perioperatória de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea³⁵ e, mais recentemente, estuda-se o seu papel no aumento da recidiva tumoral em pacientes cirúrgicos oncológicos³³. O controle da dor aguda perioperatória, principalmente por meio da anestesia regional, é importante para aumentar o conforto do paciente, diminuir a incidência de atelectasia, pneumonia e fenômenos tromboembólicos, além de possível redução na ocorrência de dor crônica³³. Todos esses fatores colocam a anestesiologia como especialidade-chave no contexto da medicina perioperatória, e as técnicas anestésicas podem influenciar a morbimortalidade perioperatória.

O primeiro relato do efeito protetor dos anestésicos inalatórios sobre as lesões de I/R ocorreu em 1976, quando Bland e Lowenstein descreveram a propriedade do halotano em diminuir as alterações eletrocardiográficas do segmento S-T em cachorros submetidos à I/R coronariana³⁶. Entretanto, apenas a partir de 1997, com a demonstração do efeito protetor do isoflurano na I/R cardíaca, houve ressurgimento do interesse sobre a propriedade protetora dos anestésicos inalatórios nas lesões de I/R e, então, uma série de estudos sobre o assunto passou a ser desenvolvida³⁶.

As propriedades anestésicas do sevoflurano foram descobertas em 1971, entretanto, sua aprovação para uso clínico nos Estados Unidos e Europa se deu apenas em 1995³⁷. O sevoflurano tem, dentre suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, odor não pungente, ausência de irritação de vias aéreas, baixa solubilidade sangue-gás, pouca interferência na estabilidade cardiovascular e respiratória, e baixa interação com outras drogas, o que o tornam seguro para indução e manutenção da anestesia³⁷. Sua administração se dá por via inalatória por meio de vaporizadores capazes de transformar o anestésico da fase líquida para a gasosa. Cerca de 3-5% da molécula é metabolizada no fígado em

compostos fluorinados, e o restante é eliminado de maneira intacta pelos pulmões³⁷. Quanto maior a duração da exposição ao sevoflurano, mais compostos fluorinados são produzidos³⁷. A metabolização e eliminação renal desses compostos podem resultar em aumento dos níveis séricos de creatinina, embora nenhuma repercussão clínica tenha sido observada em humanos³⁷.

Diversos estudos foram realizados sobre o efeito do sevoflurano nas lesões de I/R em órgãos e tecidos, como, por exemplo: coração^{38,39}, pulmão⁴⁰, sistema nervoso central⁴¹ e retina⁴². Estas pesquisas demonstraram a capacidade do anestésico de reduzir a intensidade das lesões de I/R.

Estudos experimentais e clínicos demonstraram a proteção do sevoflurano sobre as lesões de I/R hepáticas⁴³⁻⁴⁷. Bedirli *et al.* verificaram que a administração de sevoflurano antes e durante a I/R hepática foi capaz de diminuir os níveis séricos de transaminases, aumentar o fluxo sanguíneo hepático, diminuir os níveis de malondialdeído e aumentar o conteúdo de ATP nos hepatócitos de ratos submetidos à I/R hepática⁴³. Zhou *et al.* observaram que o sevoflurano administrado apenas antes da isquemia hepática, como pré-condicionamento, reduziu as transaminases, os níveis malondialdeído e a atividade da mieloperoxidase, e aumentou a ação da superóxido dismutase em ratos submetidos à I/R hepática⁴⁴. Esse efeito protetor foi independente da dose de anestésico estudada⁴⁴. Recente ensaio clínico randomizado demonstrou que a administração de sevoflurano por 30 minutos antes do clampeamento do pedículo hepático em hepatectomias foi capaz de diminuir os níveis de transaminases e o risco de complicações pós-operatórias de pacientes submetidos a hepatectomias extensas⁴⁵. Minou *et al.* administraram sevoflurano a doadores de fígado cadáveres e, durante o implante no fígado do receptor, observaram queda dos níveis de transaminases e redução da incidência de disfunção primária de enxerto após transplante hepático⁴⁶.

Os trabalhos descritos acima destacam dois protocolos que demonstraram o efeito protetor do sevoflurano sobre as lesões de I/R

hepáticas. O primeiro utiliza o anestésico antes e durante todo o período de I/R (sevoflurano contínuo). No segundo, sevoflurano é administrado apenas antes do início da isquemia hepática (pré-condicionamento). Entretanto, os estudos realizados até o momento não permitem avaliar se o efeito protetor do pré-condicionamento com sevoflurano nas lesões de I/R hepáticas é semelhante ao efeito da administração contínua do anestésico inalatório durante todo o período de I/R.

Levando em consideração a proteção sevoflurano na lesão de I/R hepática já descrita na literatura, é possível que ela se dê por pré-condicionamento ou que seja máxima com sua administração durante todo o período de I/R hepática.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do pré-condicionamento com sevoflurano ou da sua administração contínua nas lesões locais e sistêmicas da isquemia/reperfusão hepática em ratos.

3 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica – LIM/37 da Disciplina de Transplantes de Órgãos do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob número 147/2012. Foram respeitadas as normas do *Guide For The Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council. National Academy Press. 7th ed. Washington D.C., 1996.*

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 51 *Rattus albinus*, machos, da linhagem Wistar, com peso entre 230 e 280 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no LIM/37, em gaiolas coletivas, com livre acesso à água filtrada e alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA.). A temperatura do ambiente foi mantida ao redor de 21°C.

3.2 Sevoflurano

O anestésico inalatório sevoflurano (Abbott, São Paulo, Brasil) foi utilizado em concentração expirada de 2% (Figura 3), equivalente a 1

concentração alveolar mínima do anestésico (CAM), medida por meio de analisador de gases (Monitor Infinity Delta, Dräger, Alemanha) e administrado por via inalatória com auxílio de vaporizador de sevoflurano calibrado (Takaoka, Brasil) pela cânula traqueal com fluxo de oxigênio a 100% 1l/min.

3.3 Delineamento experimental

Todos os animais do experimento foram submetidos à indução anestésica, intubação orotraqueal e laparotomia mediana.

Os animais do experimento foram divididos em 1 grupo controle e 3 grupos experimentais (Figura 2):

Grupo 1 – SHAM (Controle; n=12): animais submetidos à laparotomia mediana com manipulação cirúrgica do fígado, sem indução de isquemia hepática e avaliados após 5 horas da laparotomia.

Os animais dos grupos experimentais foram submetidos a 1 hora de isquemia hepática e avaliados após 4 horas de reperfusão.

Grupo 2 – Sem tratamento (STO; n= 13): animais sem administração de sevoflurano durante o experimento.

Grupo 3 – Pré-condicionamento (SE30; n=13): animais submetidos à administração de sevoflurano por 30 minutos entre a indução anestésica e o início da isquemia hepática. A administração do sevoflurano foi interrompida após o início da isquemia hepática.

Grupo 4 – Sevoflurano contínuo (SECO; n=13): animais submetidos à administração de sevoflurano por 30 minutos entre a indução anestésica e o início da isquemia hepática. A administração do sevoflurano continuou durante todo o período de I/R.

Figura 2 – Representação esquemática do delineamento experimental.

3.4 Indução da Isquemia/Reperusão hepática

A indução anestésica foi realizada em todos os grupos por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina a 5% (Ketalar[®], Cristália), 30mg/kg e cloridrato de xilazina 2% (Rompum[®], Bayer), 30mg/kg; em seguida, os animais foram submetidos à intubação orotraqueal com cateter nº16 (Jelco[®]) e à ventilação mecânica (*Harvard Rodent Ventilator*, USA), com frequência de 60rpm e volume corrente de 0,08 ml/g⁴⁸ (Figura 3).

A temperatura corpórea foi mantida entre 35 e 37°C com o auxílio de uma lâmpada halógena de 45W e 127V, e monitorada por termômetro retal digital (*YSI Precision 4000^A Thermometer*, USA) (Figura 3).

Figura 3 - Preparação para início da cirurgia. Intubação orotraqueal com Jelco® n° 16. Monitorização da oximetria, frequência respiratória, fração expirada de anestésico inalatório e capnografia. Monitorização da temperatura por termômetro retal digital.

Em todos os grupos, realizou-se laparotomia mediana de 4 cm de extensão a partir do apêndice xifoide, seguida, nos grupos 2, 3 e 4, de dissecação e oclusão, com pinça microvascular atraumática, do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral esquerdo. Esta técnica provoca isquemia em cerca de 70% do parênquima hepático, mantendo a perfusão dos lobos caudado superior e inferior, e dos lobos direito superior e inferior (Figura 4). Desta maneira, evitou-se a congestão vascular e isquemia intestinal que poderiam ocorrer caso houvesse oclusão completa do hilo hepático, com suas repercussões sobre a análise do trabalho⁴⁸⁻⁵⁰.

Figura 4 – Modelo de isquemia hepática parcial. A: dissecação e reparo do pedículo hepático comum dos lobos mediano e lateral esquerdo. B: pinçamento do pedículo com pinça microvascular atraumática; isquemia hepática parcial dos lobos mediano e lateral esquerdo (acima da pinça), com preservação da perfusão dos lobos caudado e direito (abaixo da pinça).

Após o início da isquemia, a incisão abdominal foi fechada com mononylon 4.0 em sutura contínua para evitar desidratação dos animais. Uma hora após o início da isquemia, o abdome foi reaberto e procedeu-se a retirada da pinça do pedículo hepático, dando início ao período de reperfusão. A incisão foi novamente fechada durante o período de reperfusão⁴⁹.

Os animais dos grupos 1, 2 e 3, quando completamente recuperados da anestesia, foram extubados após o fim da isquemia, sendo, então, acondicionados em gaiolas individuais. Os animais do grupo 4 permaneceram em ventilação mecânica durante todo o período de I/R, permitindo a administração contínua do anestésico inalatório (Figura 2).

3.5 Coleta de materiais para análise

Quinze minutos antes de completar as 4 horas de reperfusão hepática, os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram, novamente, anestesiados com cloridrato de cetamina 5% (Ketalar[®], Cristália), 40mg/kg. Seis animais do grupo SHAM, oito animais do grupo STO, e nove animais dos grupos SE30 e SECO receberam corante azul de Evans (AE) a 2,5% (*Sigma-Chemical Company*, USA), 20mg/kg, administrado pela veia dorsal peniana. Completadas 4 horas de reperfusão, realizou-se a abertura da incisão abdominal e foi coletado 5ml de sangue por punção cardíaca transdiafragmática. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por secção da aorta abdominal e da veia cava inferior.

Após a retirada do fígado, os lobos isquêmicos (mediano e lateral esquerdo) e os não isquêmicos (caudado superior e inferior, e direito superior e inferior) foram identificados e separados para estudo da respiração mitocondrial, determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) e análise histológica. Procedeu-se, a seguir, cateterização da artéria pulmonar com cateter de 2,0mm de diâmetro (Silastic, Dow Corning, n^o 602.175) para permitir lavagem do pulmão com 30 a 50ml de solução salina fisiológica a 0,9%, administrada na velocidade de 10ml/min. Ao final da lavagem, os pulmões foram removidos, e enviados para análise do AE e quantificação da atividade da mieloperoxidase tecidual (MPO).

As dosagens de aspartato aminotransferase (AST), alaina aminotransferase (ALT) e creatinina foram realizadas em todas as amostras de sangue dos animais. A dosagem dos mediadores inflamatórios, entretanto, foi realizada apenas nos animais não submetidos à injeção do corante AE, tendo em vista que esse corante interfere nas suas dosagens (Grupo SHAM: n=6; STO e SECO: n=5; SE30: n=4).

3.6 Dosagem das transaminases

A quantificação das transaminases AST e ALT foi realizada pelo método ultravioleta otimizado (COBRAS MIRA, Roche) de acordo com a *International Federation of Clinical Chemistry*. Elas foram avaliadas como indicadores de lesão nos hepatócitos. Seus resultados foram expressos em u/L.

3.7 Avaliação das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais

Para avaliação da função mitocondrial hepática, os lobos isquêmicos e não isquêmicos foram imersos em solução de homogeneização para extração e isolamento de mitocôndrias em pH 7,4, contendo sacarose, ácido etilenoglicol tetracético (EGTA), albumina humana e hepes⁵¹.

Foi utilizado estudo polarográfico da mitocôndria para determinação do consumo de oxigênio. Ele foi realizado utilizando o oxígrafo 5/6 H (*Gilson Medical Eletronics, Inc.*) com eletrodo de oxigênio com temperatura controlada a 28°C (Clark, *Yellow Springs Instruments Co, Yellow Springs, Ohio*)⁵².

A suspensão de mitocôndrias foi colocada no compartimento de vidro do eletrodo de oxigênio. Após a adição de succinato de potássio, realizou-se o registro do estado basal ou estado 4 (S4) da respiração mitocondrial. A seguir, adenosina difosfato (ADP, *Sigma Chemical Company*, St. Louis, Missouri) foi acrescentada à amostra para quantificação da fosforilação do ADP em ATP, observada no estado 3 (S3) ou ativado da respiração mitocondrial. Após o esgotamento do ADP do meio, o estado S4 registrado no oxígrafo foi, novamente, anotado.

Para avaliação dos índices das funções oxidativas e fosforilativas da mitocôndria, foram utilizadas a razão de controle respiratório (RCR) e a

razão ADP/consumo de oxigênio (ADP/O). A razão da velocidade de consumo de oxigênio da presença de ADP, ou estado 3 (S3), e na ausência de ADP, ou estado 4 (S4), foi utilizada para o cálculo do RCR⁵³.

Os estados S3 e S4 das cadeias oxidativas e fosforilativas mitocondriais foram expressos em ng de átomos de oxigênio/mg de proteína/minuto⁵⁴.

3.8 Avaliação da peroxidação lipídica do 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, ao sobrenadante, foi adicionada 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 nmol MDA/mg proteína⁵⁵.

3.9 Análise histológica do fígado

Amostras representativas dos lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos de todos os grupos foram fixadas em formol salino a 10%, submetidas a processamento histológico de rotina e coradas pela hematoxilina & eosina.

Uma única patologista analisou as seguintes variáveis morfológicas, sem ter acesso a que grupo pertenciam as lâminas (quadro 1): a) tumefação hepatocelular, definida como o alargamento e clareamento citoplasmáticos, eventualmente com obliteração sinusoidal, fenômeno potencialmente reversível, associado à entrada de água intracelular; b) retração hepatocelular, definida como picnose nuclear e eosinofilia citoplasmática com redução do volume celular, associada à perda de água intracelular, fenômeno irreversível que, associado aos mecanismos fisiológicos de morte celular, pode ser a expressão fenotípica de apoptose; c) esteatose hepatocelular, definida como a presença de gotículas claras e bem delimitadas intracelulares; d) necrose de coagulação, definida como citoplasmas róseos de limites imprecisos com núcleos picnóticos ou desprovidos de núcleo; e) inflamação lobular, definida pela presença de áreas de necrose focal permeadas por células inflamatórias; f) inflamação portal, definida pelo aumento da população de células inflamatórias no espaço-porta; g) celularidade sinusoidal, definida como hiperplasia ou hipertrofia das células sinusoidais.

A cada uma das variáveis estudadas, foi atribuído valor de zero a três, sendo zero correspondente à ausência da alteração pesquisada; um, à presença discreta e focal; dois, à presença moderada; e três, à presença intensa.

A quantificação da intensidade da lesão de I/R hepática foi realizada nos lobos isquêmicos e não isquêmicos, e se deu por um critério de pontuação global das amostras. Essa pontuação foi conseguida somando-se os pontos de cada variável histológica estudada, com a observação de ser atribuído para a variável necrose de coagulação o peso três, devido ao fato de esta variável ser a mais implicada no prognóstico da lesão de I/R⁵⁶. Desta maneira, o escore histológico da lesão de I/R variou de 0 a 27 pontos (Quadro 1).

Além do escore histológico descrito acima, a intensidade da lesão de I/R hepática também foi avaliada pelo índice de necrose isoladamente, definido como a intensidade da ocorrência de necrose de coagulação multiplicada por três.

Quadro 1 - Graduação histológica da lesão de I/R hepática adaptada de Quireze *et al.*⁵⁶.

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

3.10 Análises teciduais pulmonares

3.10.1 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar

A quantificação do corante AE extraído foi utilizada para avaliação da permeabilidade vascular pulmonar. Este corante tem alta taxa de ligação proteica no plasma, principalmente a albumina. Com o processo inflamatório secundário às lesões de I/R, há um aumento da permeabilidade capilar pulmonar, o que possibilita o extravasamento do complexo azul de Evans/albumina e sua deposição no interstício pulmonar⁵⁷.

Para a extração do AE, um fragmento de pulmão foi incubado em tubos de ensaio com formamida (BDH Labs, England), na dose de 4 µg/mg de tecido, por 24 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, a quantificação do corante extraído se deu por espectrofotometria, por meio do espectrofotômetro ELX 808 *Ultra Microplate Reader* (Bio-Tek Instruments, Inc, USA) com comprimento de onda de 620nm. Os resultados foram expressos em mg de azul de Evans/g de tecido seco.

3.10.2 Atividade da mieloperoxidase pulmonar

A atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO) foi utilizada como indicador da quantidade de neutrófilos sequestrados no pulmão. As amostras de 300mg de tecido pulmonar foram homogeneizadas com o homogeneizador de tecidos (Polytron PT-2100 homogenizer, Kinematica AG, Luzern, Switzerland) por 60 segundos em 1ml de solução tampão de fosfato de sódio a 0.1M, pH 6.2, contendo 0,5g/dL de hexadecil e 5mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após a homogeneização, as amostras foram submetidas a ondas ultrassonográficas de 40 Hz utilizando

sonicador (*Sonics & Materials Inc, Newton, CT, USA*) 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 serão expressos em DO a 490 nm^{58,59}.

3.11 Dosagem dos mediadores inflamatórios

O TNF- α e as interleucinas IL-6 e IL-10 foram quantificados nas amostras de plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) por meio da utilização de *kits* comerciais (*Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA*). Depois da coleta, cada amostra de sangue foi, imediatamente, centrifugada por 10 minutos a 0°C, e o sobrenadante estocado a -20°C. Os resultados foram expressos em pg/ml.

3.12 Dosagem de creatinina

A dosagem de creatinina foi avaliada como indicador de lesão renal. A quantificação foi realizada pelo método Jaffe modificado (Roche). Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.13 Análise estatística

A análise descritiva foi realizada por meio de gráficos e tabelas. Utilizou-se médias, medianas e desvio-padrão 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 ANOVA⁶⁰ ou Kruskal-Wallis⁶⁰, seguidos, quando necessário, pelo procedimento de comparações múltiplas por Tukey⁶⁰ ou Tukey não paramétrico⁶¹, 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.

Utilizou-se o programa R versão 2.15.2 (*The R Foundation for Statistical Computing*) para análise estatística e considerou-se estatístico $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Resultados do pré-condicionamento com sevoflurano

4.1.1 Dosagem das transaminases: AST e ALT

Os níveis séricos de AST e de ALT nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento foram significativamente maiores que no grupo sham. Não foi encontrada diferença entre os níveis de transaminases nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figuras 5 e 6; Anexos A e B).

Figura 5 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de AST.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

Figura 6 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de ALT.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

4.1.2 Avaliação das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais

4.1.2.1 Lobos hepáticos isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial

4.1.2.1.1 Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

O estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos dos animais dos grupos sem tratamento e pré-condicionamento foram significativamente menores que no grupo sham. Não houve diferença de S3 entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 7; Anexo C).

Figura 7 - Valores médios $\pm$ DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,008$

SHAM x SE30: $p = 0,001$

4.1.2.1.2 Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

Na avaliação do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial, ou estado basal, não houve diferença entre os grupos estudados (Figura 8; Anexo D).

Figura 8 - Valores médios $\pm$ DP do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

4.1.2.1.3 Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

A razão de controle respiratório (RCR) dos lobos isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento. Não houve diferença do RCR entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 9; Anexo E).

Figura 9 - Valores médios $\pm$ DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

4.1.2.1.4 Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

A razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento. A razão ADP/O do grupo sem tratamento foi menor que no grupo pré-condicionamento (Figura 10; Anexo F).

Figura 10 - Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

STO x SE30: $p = 0,049$

4.1.2.2 Lobos hepáticos não isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial

4.1.2.2.1 Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

O estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos foi significativamente menor no grupo pré-condicionamento que nos grupos sham e sem tratamento. Não houve diferença do estado 3 (S3) dos lobos não isquêmicos entre os grupos sham e sem tratamento (Figura 11; Anexo G).

Figura 11 - Valores médios $\pm$ DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey

SHAM x SE30: $p = 0,023$

STO x SE30: $p = 0,036$

4.1.2.2.2 Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

Na avaliação do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial, ou estado basal, dos lobos hepáticos não isquêmicos, o grupo sem tratamento apresentou valores de S4 maiores que o grupo pré-condicionamento. Não houve diferença nos valores de S4 dos lobos não isquêmicos entre os grupos sham e sem tratamento, nem entre os grupos sham e pré-condicionamento (Figura 12; Anexo H).

Figura 12 - Valores médios $\pm$ DP estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

STO x SE30: $p = 0,003$

4.1.2.2.3 Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

A razão de controle respiratório (RCR) dos lobos não isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento. Não houve diferença no RCR dos lobos não isquêmicos entre grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 13, Anexo I).

Figura 13 - Valores médios $\pm$ DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,004$

SHAM x SE30: $p = 0,003$

4.1.2.2.4 Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

A razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos não isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que no grupo sem tratamento. Não houve diferença na razão ADP/O nos lobos não isquêmicos entre os grupos sham e pré-condicionamento, nem entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 14; Anexo J).

Figura 14 - Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,037$

4.1.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático

4.1.3.1 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos isquêmicos

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos sham, sem tratamento e pré-condicionamento na avaliação da peroxidação lipídica (concentração de MDA) dos lobos hepáticos isquêmicos (Figura 15; Anexo K).

Figura 15 - Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

4.1.3.2 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos sham, sem tratamento e pré-condicionamento na avaliação da peroxidação lipídica (concentração de MDA) dos lobos hepáticos não isquêmicos (Figura 16; Anexo L).

Figura 16 - Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

4.1.4 Análise histológica do fígado

4.1.4.1 Análise histológica dos lobos hepáticos isquêmicos

4.1.4.1.1 Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos

O índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos foi significativamente menor no grupo sham que nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento. Não houve diferença entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 17; Anexo M).

Figura 17 - Valores médios $\pm$ DP do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

4.1.4.1.2 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos

O escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos foi significativamente menor no grupo sham que nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento. Não houve diferença entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 18; Anexo N).

Figura 18 - Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

4.1.4.2 Análise histológica dos lobos hepáticos não isquêmicos

4.1.4.2.1 Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não foi encontrada necrose de coagulação nos lobos hepáticos não isquêmicos nos grupos sham, sem tratamento e pré-condicionamento (Anexo O).

4.1.4.2.2 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos

Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos sham, sem tratamento e pré-condicionamento no escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos (Figura 19; Anexo P).

Figura 19 - Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento.

4.1.5 Análises teciduais pulmonares

4.1.5.1 Permeabilidade vascular pulmonar: azul de Evans

Os níveis do corante azul de Evans extraído do tecido pulmonar dos animais dos grupos sem tratamento e pré-condicionamento foram significativamente maiores que no grupo sham. Os níveis de AE foram iguais entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 20; Anexo Q).

Figura 20 - Valores médios $\pm$ DP da concentração do corante azul de Evans (AE) no tecido pulmonar.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0,012$

4.1.5.2 Atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO)

Os resultados da atividade de MPO do grupo sem tratamento foram significativamente maiores que o grupo sham. Não houve diferença na atividade de MPO entre os grupos sham e pré-condicionamento nem entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 21; Anexo R).

Figura 21 - Valores médios $\pm$ DP da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO).

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,028$

4.1.6 Mediadores inflamatórios

4.1.6.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Os níveis séricos de TNF- α nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento foram significativamente maiores que no grupo sham. O nível de TNF- α no grupo pré-condicionamento foi significativamente maior que no grupo sem tratamento (Figura 22; Anexo S).

Figura 22 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de TNF- α .

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

STO x SE30: $p = 0$

4.1.6.2 Interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10)

Os níveis séricos de IL-6 e IL-10 nos grupos sem tratamento e pré-condicionamento foram significativamente maiores que no grupo sham. Não houve diferença nos níveis de IL-6 e IL-10 entre os grupos sem tratamento e pré-condicionamento (Figuras 23 e 24; Anexos T e U).

Figura 23 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-6.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

Figura 24 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-10.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SE30: $p = 0$

4.1.7 Dosagem de Creatinina

Não houve diferença estatística entre níveis séricos de creatinina nos grupos controle, sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 25; Anexo V).

Figura 25 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de creatinina.
 NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SE30: pré-condicionamento;

4.2 Resultados da administração contínua de sevoflurano

4.2.1 Dosagem das transaminases: AST e ALT

Os níveis séricos de AST e de ALT foram menores no grupo sham que nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. Os valores de AST e ALT no grupo sevoflurano contínuo foram menores que no grupo sem tratamento (Figuras 26 e 27; Anexos A e B).

Figura 26 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de AST.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

STO x SECO: $p = 0,025$

Figura 27 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de ALT.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

STO x SECO: $p = 0,04$

4.2.2 Avaliação das funções oxidativas mitocondriais

4.2.2.1 Lobos hepáticos isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial

4.2.2.1.1 Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

O estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos dos animais dos grupos sem tratamento foi significativamente menor que nos grupos sham e sevoflurano contínuo. Não houve diferença de S3 entre os grupos sham e sevoflurano contínuo (Figura 28; Anexo C).

Figura 28 - Valores médios $\pm$ DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,04$

STO x SECO: $p = 0,015$

4.2.2.1.2 Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

Na avaliação do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial, ou estado basal, não houve diferença entre os grupos sham, sem tratamento e sevoflurano contínuo (Figura 29; Anexo D).

Figura 29 - Valores médios $\pm$ DP do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

4.2.2.1.3 Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

A razão de controle respiratório (RCR) dos lobos isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. A RCR do grupo sevoflurano contínuo foi significativamente maior que no grupo sem tratamento (Figura 30; Anexo E).

Figura 30 - Valores médios $\pm$ DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

STO x SECO: $p = 0$

4.2.2.1.4 Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos

A razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. A razão ADP/O do grupo sevoflurano contínuo foi maior que do grupo sem tratamento (Figura 31; Anexo F).

Figura 31 - Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0,035$

STO x SECO: $p = 0$

4.2.2.2 Lobos hepáticos não isquêmicos: estudo da respiração mitocondrial

4.2.2.2.1 Estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não houve diferença no estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos entre os grupos sham, sem tratamento e sevoflurano contínuo (Figura 32; Anexo G).

Figura 32 - Valores médios $\pm$ DP do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

4.2.2.2.2 Estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

Na avaliação do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial, ou estado basal, dos lobos hepáticos não isquêmicos, o grupo sham apresentou valores de S4 menores que os grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. Não houve diferença nos valores de S4 dos lobos não isquêmicos entre os grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo (Figura 33; Anexo H).

Figura 33 - Valores médios $\pm$ DP do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0,05$

SHAM x SECO: $p = 0,026$

4.2.2.2.3 Avaliação da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

A razão de controle respiratório (RCR) dos lobos não isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. Não houve diferença no RCR dos lobos não isquêmicos entre os grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. (Figura 34; Anexo I).

Figura 34 - Valores médios $\pm$ DP da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,007$

SHAM x SECO: $p = 0$

4.2.2.2.4 Avaliação da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos

A razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos não isquêmicos foi significativamente maior no grupo sham que no grupo sem tratamento. Não houve diferença da razão ADP/O nos lobos não isquêmicos entre os grupos sham e sevoflurano contínuo, nem entre os grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo (Figura 35; Anexo J).

Figura 35 - Valores médios $\pm$ DP da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,015$

4.2.3 Avaliação da peroxidação lipídica do tecido hepático

4.2.3.1 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos isquêmicos

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos sham, sem tratamento e sevoflurano contínuo na avaliação da peroxidação lipídica (concentração de MDA) dos lobos hepáticos isquêmicos (Figura 36; Anexo K).

Figura 36 - Valores médios $\pm$ DP das concentrações de MDA dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo.

4.2.3.2 Peroxidação lipídica dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos sham, sem tratamento e sevoflurano contínuo na avaliação da peroxidação lipídica (concentração de MDA) dos lobos hepáticos não isquêmicos (Figura 37; Anexo L).

Figura 37 - Valores mdios ± DP das concentraes de MDA dos lobos hepticos no isqumicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contnuo.

4.2.4 Anlise histolgica do fgado

4.2.4.1 Anlise histolgica dos lobos hepticos isqumicos

4.2.4.1.1 ndice de necrose de coagulao dos lobos hepticos isqumicos

O ndice de necrose de coagulao dos lobos hepticos isqumicos foi significativamente menor no grupo sham que nos grupos sem tratamento e sevoflurano contnuo. O grupo sevoflurano contnuo apresentou ndice de necrose de coagulao dos lobos hepticos isqumicos significativamente menor que o grupo sem tratamento (Figura 38; Anexo M).

Figura 38 - Valores médios $\pm$ DP do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0,022$

STO x SECO: $p = 0$

4.2.4.1.2 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos

O escore histológico dos lobos hepáticos isquêmicos foi significativamente menor no grupo sham que nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo. O grupo sevoflurano contínuo apresentou escore histológico dos lobos hepáticos isquêmicos significativamente menor que o grupo sem tratamento (Figura 39; Anexo N).

Figura 39 - Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

STO x SECO: $p = 0.003$

4.2.4.2 Análise histológica dos lobos hepáticos não isquêmicos

4.2.4.2.1 Índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos não isquêmicos

Não foi encontrada necrose de coagulação nos lobos hepáticos não isquêmicos nos grupos sham, sem tratamento e sevoflurano contínuo (Anexo O).

4.2.4.3 Escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos

Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos sham, sem tratamento e sevoflurano contínuo no escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos (Figura 40; Anexo P).

Figura 40 - Valores médios $\pm$ DP do escore histológico da I/R dos lobos hepáticos não isquêmicos.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo.

4.2.5 Análises teciduais pulmonares

4.2.5.1 Permeabilidade vascular pulmonar: azul de Evans

Os níveis do corante azul de Evans extraído do tecido pulmonar dos animais do grupo sem tratamento foram significativamente maiores que dos grupos sham e sevoflurano contínuo. Não houve diferença nos níveis de AE entre os grupos sham e sevoflurano contínuo (Figura 41; Anexo Q).

Figura 41 - Valores médios $\pm$ DP da concentração do corante azul de Evans (AE) no tecido pulmonar.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey

SHAM x STO: $p = 0,002$

STO x SECO: $p = 0$

4.2.5.2 Atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO)

Os resultados da atividade de MPO do grupo sem tratamento foram significativamente maiores que o sham. Não houve diferença na atividade de MPO entre os grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo nem entre os grupos sham e sevoflurano contínuo (Figura 42; Anexo R).

Figura 42 - Valores médios $\pm$ DP da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO).
 NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;
 Tukey não paramétrico
 SHAM x STO: $p = 0$

4.2.6 Mediadores inflamatórios

4.2.6.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Os níveis séricos de TNF- α nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo foram significativamente maiores que no grupo sham. Não houve diferença nos níveis de TNF- α nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo (Figura 43; Anexo S).

Figura 43 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de TNF- α .

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

4.2.6.2 Interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10)

Os níveis séricos de IL-6 e IL-10 nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo foram significativamente maiores que no grupo sham. Não houve diferença nos níveis de IL-6 e IL-10 entre os grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo (Figuras 44 e 45; Anexos T e U).

Figura 44 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-6.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

Figura 45 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de IL-10.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;

Tukey não paramétrico

SHAM x STO: $p = 0$

SHAM x SECO: $p = 0$

4.2.7 Dosagem de creatinina

Os níveis séricos de creatinina foram significativamente maiores no grupo sevoflurano contínuo que nos grupos sham e sem tratamento. Não houve diferença estatística nos níveis séricos de creatinina entre os grupos sham e sem tratamento (Figura 46; Anexo V).

Figura 46 - Valores médios $\pm$ DP dos níveis séricos de creatinina.

NOTA: SHAM: controle; STO: sem tratamento; SECO: sevoflurano contínuo;
Tukey

SHAM x SECO: $p = 0$ STO x SECO: $p = 0,003$

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O avanço das técnicas cirúrgicas e anestésicas permitiu que cirurgias hepáticas cada vez mais complexas, como transplante hepático e ressecções de segmentos hepáticos múltiplos, fossem desenvolvidas e realizadas na prática diária com excelentes resultados. Com o aumento da complexidade dos procedimentos, estratégias que visam à proteção do parênquima hepático residual, ou de todo o órgão transplantado, precisaram ser desenvolvidas com o objetivo de reduzir as lesões locais e sistêmicas decorrentes.

A lesão de I/R hepática pode ocorrer durante transplante hepático, ressecções hepáticas amplas, sangramentos hepáticos maciços, entre outros. Ela é um fenômeno predominantemente inflamatório que, quando grave, pode resultar em insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas, e no óbito do paciente^{1,4}.

Entre as estratégias protetoras que visam reduzir a intensidade das lesões de I/R hepáticas, destaca-se o pré-condicionamento isquêmico, que consiste na indução de curtos períodos de isquemia hepática seguidos de reperfusão antes do início da isquemia prolongada⁶². 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). Curtos períodos de I/R reperfusão hepáticas aumentariam de forma discreta a concentração de EROs, e estes seriam responsáveis pela abertura do mitoKATP. Com a ativação do mitoKATP, há influxo de potássio para o interior da mitocôndria com redução paralela do influxo de cálcio, o que manteria a homeostase da organela, preservaria suas funções oxidativas e reduziria a geração de EROs^{63,64}.

Como vimos anteriormente, o sevoflurano é anestésico inalatório amplamente estudado no contexto da I/R de diversos órgãos³⁸⁻⁴², inclusive no fígado⁴³⁻⁴⁷. Estudos experimentais já demonstraram que o efeito protetor

desta droga sobre as lesões de I/R também envolve a ativação do mitoKATP^{65,66} e a redução da produção de EROs⁶⁷. Desta maneira, o sevoflurano agiria de forma semelhante ao pré-condicionamento isquêmico e seria capaz de reduzir as lesões de I/R hepáticas. No presente estudo, observamos redução significativa nos níveis séricos das transaminases (AST e ALT) no grupo de animais submetidos à administração contínua de sevoflurano durante todo o período de I/R (grupo sevoflurano contínuo) em relação ao grupo sem tratamento (Figuras 26 e 27); entretanto, nenhuma redução foi observada no grupo tratado com sevoflurano apenas antes da isquemia (grupo pré-condicionamento) em relação aos animais não tratados (Figuras 5 e 6).

A redução da produção de EROs, secundária à ativação do mitoKATP e preservação das funções oxidativas mitocondriais, poderia diminuir a peroxidação lipídica no tecido hepático (MDA). Entretanto, diferentemente de outros estudos^{43,44}, neste modelo experimental, não observamos diferença de concentração de MDA entre os grupos nos lobos hepáticos isquêmicos e não isquêmicos (Figuras 15, 16, 36 e 37). A avaliação de MDA não foi capaz de demonstrar redução da produção de EROs no presente estudo, entretanto, outras análises precisariam ser realizadas para confirmar este achado.

Em relação às funções mitocondriais dos lobos hepáticos isquêmicos, este estudo demonstrou que os animais do grupo sevoflurano contínuo apresentaram valores de S3, RCR e ADP/O significativamente maiores que o grupo sem tratamento (Figuras 28, 30 e 31), inclusive com valores de S3 iguais aos do grupo sham (Figura 28). Já em relação ao grupo pré-condicionamento, não foi observada diferença nos valores de S3 e RCR em relação ao grupo sem tratamento (Figuras 7 e 9), apenas maior valor da razão ADP/O (Figura 10). Não houve diferença entre os valores de S4 entre os grupos estudados (Figuras 8 e 29). Os achados descritos acima indicam preservação das funções mitocondriais nos animais do grupo sevoflurano contínuo. Esta preservação da função mitocondrial provavelmente gerou

menor dano tecidual e se refletiu na redução dos níveis séricos de transaminases nos animais deste grupo.

Já em relação aos lobos hepáticos não isquêmicos, foi demonstrada uma redução da RCR nos grupos pré-condicionamento, sem tratamento e sevoflurano contínuo em relação ao grupo sham (Figuras 13 e 34). Esta redução da RCR sugere que houve discreto comprometimento da função mitocondrial também nos lobos hepáticos não isquêmicos, mas, novamente, demonstram que a lesão foi menor no grupo sevoflurano contínuo em relação ao sem tratamento (Figura 34).

Ainda a respeito das alterações locais da I/R reperfusão hepática, foi realizada análise histológica de amostras dos lobos isquêmicos e não isquêmicos. Nos lobos isquêmicos, não foi observada diferença no índice de necrose de coagulação e no escore histológico entre os grupos pré-condicionamento e sem tratamento (Figuras 17 e 18). Entretanto, houve redução significativa do índice de necrose e do escore histológico no grupo sevoflurano contínuo em relação ao grupo sem tratamento (Figuras 38 e 39). Já em relação aos lobos não isquêmicos, não foi encontrada nenhuma alteração histológica nos grupos (Figuras 19 e 40). Esses resultados sugerem que a administração contínua de sevoflurano atuou como efeito protetor contra o desenvolvimento de necrose de coagulação e de alterações histológicas globais, efeito não observado no grupo pré-condicionamento. Adicionalmente, a alteração da função mitocondrial dos lobos não isquêmicos, avaliada a partir da redução da RCR, não levou a lesões histológicas no parênquima hepático.

Analisando as lesões locais da I/R hepática, ao contrário do sugerido pela literatura⁴⁴⁻⁴⁶, verificamos, neste modelo, que apenas a administração contínua de sevoflurano durante todo o período de I/R apresentou efeito protetor, com redução dos níveis de transaminases séricas, da ocorrência de necrose de coagulação e do escore histológico nos lobos hepáticos isquêmicos. Aparentemente, a preservação da função oxidativa mitocondrial no grupo sevoflurano contínuo contribuiu para os resultados.

Os mediadores inflamatórios liberados pelas CK ativadas, neutrófilos, linfócitos T NK e linfócitos T CD4+¹ pioram a lesão tecidual local e induzem o aparecimento de lesões a distância^{1,69,70}. A principal citocina pró-inflamatória associada ao fenômeno de I/R é o TNF- α ¹. Diferentemente de estudo recentemente publicado, no qual os níveis de TNF- α tiveram tendência de redução em ratos expostos a sevoflurano durante todo o período de I/R hepática⁴³, os níveis de TNF- α aumentaram nos grupos sem tratamento e sevoflurano contínuo, sem diferença entre eles (Figura 43). Já em relação ao grupo pré-condicionamento, neste modelo, houve aumento dos níveis de TNF- α (Figura 22), o que pode sugerir que a retirada do anestésico inalatório após o início da isquemia hepática interferiu na resposta inflamatória do grupo pré-condicionamento. Outras citocinas liberadas durante a I/R hepática são a IL-6 e IL-10. Elas atuam diminuindo a produção de TNF- α ¹. Este estudo demonstrou, em todos os grupos, aumento nos níveis séricos de IL-6 e IL-10, sem diferença significativa entre eles (Figuras 23, 24, 44 e 45). Estes resultados podem demonstrar uma tentativa fisiológica de contrabalancear a reação inflamatória associada à I/R.

O aumento da resposta inflamatória sistêmica está implicado nas lesões a distância da I/R hepática¹. Pulmões e rins podem ser acometidos. A lesão pulmonar caracteriza-se por aumento da permeabilidade vascular, pelo surgimento de edema tecidual e, também, pelo acúmulo de neutrófilos no pulmão⁷¹⁻⁷³.

A avaliação da permeabilidade capilar pulmonar neste estudo foi realizada com a quantificação da concentração do corante azul de Evans no tecido pulmonar. Não houve diferença entre os grupos pré-condicionamento e sem tratamento em relação à concentração de AE no tecido pulmonar (Figura 20). Entretanto, o valor da concentração de AE no grupo sevoflurano contínuo foi significativamente menor que no grupo sem tratamento e igual aos valores do grupo sham (Figura 41). Mais uma vez, demonstrou-se a redução apenas no grupo sevoflurano contínuo da permeabilidade capilar pulmonar e, assim como os valores de S3 da respiração mitocondrial (Figura

28), a concentração de AE no grupo sevoflurano contínuo foi igual à do grupo sham.

O sequestro de neutrófilos no pulmão foi quantificado por meio da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO). Houve aumento nos valores de MPO em todos os grupos experimentais em relação ao grupo sham e, diferentemente de outros estudos⁴⁴, não houve efeito protetor do grupo pré-condicionamento ou do grupo sevoflurano contínuo em relação ao grupo sem tratamento (Figuras 21 e 42).

A lesão renal associada à I/R hepática foi quantificada pela dosagem de creatinina sérica. Não foi verificada diferença entre os níveis séricos de creatinina nos grupos sham, sem tratamento e pré-condicionamento (Figura 25). Houve aumento da creatinina sérica no grupo sevoflurano contínuo (Figura 46), o que, provavelmente, não se deve à lesão renal associada ao fenômeno de I/R e sim à metabolização do anestésico a compostos fluorinados que acabam por elevar os níveis séricos de creatinina³⁷. Este resultado está de acordo com a literatura e é importante salientar que o aumento dos níveis de creatinina associados a infusões prolongadas de sevoflurano não possui repercussões clínicas em humanos³⁷.

Diferentemente de estudo experimental recentemente publicado⁴⁴, neste modelo, o pré-condicionamento com sevoflurano não foi capaz de reduzir as lesões associadas à I/R hepática. Essa diferença pode ser consequência dos diferentes tempos de reperfusão estudados (2 x 4 horas)⁴⁴. Adicionalmente, ensaio clínico randomizado⁴⁵ demonstrou efeito protetor do pré-condicionamento com sevoflurano sobre as lesões de I/R hepáticas de pacientes submetidos a hepatectomias; entretanto, este ensaio realizou administração contínua de propofol durante o período de I/R, o que pode ter influenciado os resultados devido à ação sinérgica do propofol sobre o mitoKATP⁶⁸.

Neste estudo, apenas a administração contínua de sevoflurano reduziu as lesões locais e sistêmicas associadas à I/R hepática. Este resultado está de acordo com estudos experimentais⁴³ e clínicos publicados⁴⁶, em que a

administração contínua de sevoflurano durante todo o período de I/R foi capaz de diminuir as lesões locais e sistêmicas associadas à I/R hepática.

O efeito protetor da administração contínua de sevoflurano foi demonstrado pela redução dos níveis séricos de transaminases, da ocorrência de necrose de coagulação e do escore histológico nos lobos hepáticos isquêmicos, e da permeabilidade vascular pulmonar. Embora outros mecanismos, como o aumento do fluxo sanguíneo hepático nos animais do grupo sevoflurano contínuo⁴³, possam estar envolvidos, neste modelo, o efeito protetor da administração contínua de sevoflurano sobre a I/R hepática provavelmente foi secundário à preservação da função oxidativa mitocondrial dos hepatócitos.

Ao contrário dos estudos que demonstraram que o propofol possui efeito protetor sobre as lesões de I/R com a ativação do mitoKATP⁶⁸, outros estudos evidenciaram que a cetamina poderia ter efeito contrário, ou seja, poderia bloquear o mitoKATP e, conseqüentemente, o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico sobre as lesões de I/R^{74,75}. Há, ainda, indícios de que há uma relação direta entre a dose de cetamina administrada e o bloqueio do mitoKATP, ou seja, quanto maior a dose maior o bloqueio⁷⁵. Neste estudo, os animais dos grupos sham, sem tratamento e pré-condicionamento, foram extubados após o fim da isquemia; entretanto, os do grupo sevoflurano contínuo permaneceram em ventilação mecânica durante todo o período de I/R. Esta medida foi necessária para evitar a administração adicional de cetamina ou propofol para manutenção da anestesia geral nos três primeiros grupos, impedindo, assim, as interferências destes anestésicos na análise dos resultados. Embora improvável, a otimização da ventilação nos animais do grupo sevoflurano contínuo pode ter tido interferência nos resultados.

Outras evidências experimentais e clínicas são necessárias para concluir que o efeito protetor do sevoflurano sobre as lesões de I/R hepática depende de sua administração contínua durante todo o período de I/R.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- O pré-condicionamento com sevoflurano não apresentou efeito protetor sobre as lesões locais e sistêmicas da I/R hepáticas;
- A administração contínua de sevoflurano durante todo o período de I/R hepática reduziu as lesões locais no fígado isquêmico e a distância nos pulmões.

7 ANEXOS

ANEXO A - Valores séricos de aspartato aminotransferase (AST).

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	312	3493	5092	1869
2	135	4139	3553	3200
3	161	4567	9000	1863
4	253	4399	2600	2298
5	380	5700	6050	1050
6	160	2400	2800	400
7	140	13800	7850	5850
8	320	11350	11550	5313
9	203	3500	13320	3700
10	261	8660	8660	7800
11	224	4430	7800	2500
12	202	9150	11600	2450
13	-	7050	11850	6900
Média	229,25	6356,77	7825	3476,38
DP	78,13	3440,43	3628,84	2300,04

ANEXO B - Valores séricos de alanina aminotransferase (ALT).

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	106	2223	4212	1084
2	54	3428	3559	2600
3	66	4143	6350	1523
4	52	2512	2200	1833
5	100	6050	5150	900
6	80	1850	2300	250
7	40	9300	7900	5900
8	74	8350	10150	3611
9	54	3250	13080	3800
10	101	9840	9100	6600
11	53	7350	6600	3500
12	64	9000	11800	2700
13	-	10050	11750	7000
Média	70,33	5949,69	7242,38	3177
DP	22,05	3157,44	3715,91	2192,09

ANEXO C - Valores do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	55,51	18,77	10,57	30,27
2	46,88	33,18	26,26	79,67
3	48,86	55,83	23,7	58,13
4	53,98	17,72	25,05	64,94
5	59,44	30,68	-	64,81
6	59,70	-	-	-
Média	54,06	31,24	21,39	59,56
DP	5,32	15,39	7,29	18,17

ANEXO D - Valores do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	14,97	12,80	9,82	12,67
2	13,39	24,03	11,79	33,41
3	14,09	24,34	17,38	20,76
4	13,93	14,18	11,66	21,98
5	16,16	17,82	-	22,87
6	17,22	-	-	-
Média	14,96	18,63	12,66	22,34
DP	1,47	5,39	3,27	7,4

ANEXO E - Valores da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	3,71	1,47	1,08	2,39
2	3,5	1,38	2,23	2,38
3	3,47	2,29	1,36	2,80
4	3,87	1,25	2,15	2,95
5	3,69	1,72	-	2,83
6	3,47	-	-	-
Média	3,62	1,62	1,7	2,67
DP	0,16	0,41	0,57	0,27

ANEXO F - Valores da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	1,97	1,36	1,69	1,85
2	1,97	1,18	1,69	1,91
3	1,97	1,62	1,58	1,82
4	1,89	1,07	1,64	1,91
5	1,89	1,62	-	1,87
6	1,97	-	-	-
Média	1,94	1,37	1,65	1,87
DP	0,04	0,25	0,05	0,04

ANEXO G - Valores do estado 3 (S3) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	55,51	57,81	12,16	47,49
2	46,88	30,71	30,74	91,67
3	48,86	44,52	33,71	67,82
4	53,98	62,94	45,28	56,31
5	59,44	69,45	-	46,37
6	59,70	-	-	-
Média	54,06	53,09	30,47	61,93
DP	5,32	15,5	13,73	18,72

ANEXO H - Valores do estado 4 (S4) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	14,97	16,61	4,05	14,16
2	13,39	14,79	13,8	29,37
3	14,09	19,48	13,99	22,04
4	13,93	22,38	16,58	18,77
5	16,16	24,80	-	20,09
6	17,22	-	-	-
Média	14,96	19,61	12,11	20,89
DP	1,47	4,09	5,52	5,56

ANEXO I - Valores da razão de controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	3,71	3,48	3	3,06
2	3,5	2,08	2,23	3,12
3	3,47	2,29	2,41	3,08
4	3,87	2,81	2,73	3
5	3,69	2,80	-	2,31
6	3,47	-	-	-
Média	3,62	2,69	2,59	2,91
DP	0,16	0,54	0,34	0,34

ANEXO J - Valores da razão ADP/O da respiração mitocondrial dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	1,97	1,97	1,97	1,88
2	1,97	1,68	1,76	1,92
3	1,97	1,82	1,82	1,82
4	1,89	1,79	1,9	1,9
5	1,89	1,76	-	1,81
6	1,97	-	-	-
Média	1,94	1,37	1,65	1,87
DP	0,04	0,25	0,05	0,04

ANEXO K - Valores da concentração de malondialdeído (MDA) dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	3,1	4,7	2,5	1,4
2	2,6	4,6	1,4	1,6
3	1,7	3,11	0,9	2,6
4	3,3	4,3	4,2	2,9
5	1,5	3,35	3,7	4,4
6	3,3	4,9	3,6	4,5
7	-	3,6	3,27	3,4
8	-	2,4	4,2	3,7
9	-	-	3,7	-
Média	2,58	3,87	3,05	3,06
DP	0,81	0,89	1,2	1,17

ANEXO L - Valores da concentração de malondialdeído (MDA) dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	3,1	4,1	2,3	0,9
2	2,6	3,7	1,4	1,7
3	1,7	3,6	1,9	3,4
4	3,3	3,2	4,8	3
5	1,5	2,4	4,9	4,8
6	3,3	4,4	3,2	4,4
7	-	4,25	3,22	4,5
8	-	2,9	4,6	3,7
9	-	-	3,54	-
Média	2,58	3,57	3,32	3,3
DP	0,81	0,7	1,28	1,39

ANEXO M - Valores do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	0	6	6	3
2	0	6	3	3
3	0	6	6	3
4	0	6	3	3
5	0	3	6	0
6	-	6	3	0
7	-	9	9	3
8	-	9	3	-
9	-	-	9	-
Média	0	6,38	5,33	2,14
DP	0	1,92	2,5	1,46

ANEXO N - Valores do escore histológico dos lobos hepáticos isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	1	9	14	9
2	0	12	7	8
3	0	9	13	8
4	0	9	7	8
5	1	7	13	4
6	-	13	7	2
7	-	15	13	7
8	-	16	7	-
9	-	-	15	-
Média	0,4	11,25	10,67	6,57
DP	0,55	3,24	3,54	2,57

ANEXO O - Valores do índice de necrose de coagulação dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	-	0	0	0
7	-	0	0	0
8	-	0	0	-
9	-	-	0	-
Média	0	0	0	0
DP	0	0	0	0

ANEXO P - Valores do escore histológico dos lobos hepáticos não isquêmicos.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	1	0	1	2
2	0	1	1	0
3	0	0	1	3
4	0	0	1	1
5	1	2	3	1
6	-	1	0	1
7	-	2	0	1
8	-	0	1	-
9	-	-	0	-
Média	0,4	0,75	0,89	1,29
DP	0,55	0,89	0,93	0,95

ANEXO Q - Valores da concentração do corante azul de Evans (AE) no tecido pulmonar.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	65,08	143,60	132,31	102,41
2	136,13	336,91	398,39	151,25
3	52,85	169,05	267,35	71,81
4	134,97	291,54	276,65	21,89
5	117,32	205,41	181,48	18
6	118,43	326,85	190	140,12
7	-	258,96	493,75	58,20
8	-	158	360,40	164,25
9	-	-	55,89	-
Média	104,13	236,29	261,8	90,99
DP	36,08	77,54	138,39	57,43

ANEXO R - Valores da atividade da mieloperoxidase (MPO) pulmonar.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	0,028	0,104	0,087	0,126
2	0,026	0,125	0,046	0,180
3	0,051	0,068	0,121	0,045
4	0,068	0,045	0,050	0,043
5	0,041	0,11	0,043	0,040
6	0,040	0,09	0,054	0,035
7	-	0,055	0,14	0,094
8	-	0,118	0,061	0,064
9	-	-	0,123	-
Média	0,04	0,09	0,08	0,08
DP	0,02	0,03	0,04	0,05

ANEXO S - Valores séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	0	36	257	86
2	0	161	196	139
3	10	41	215	17
4	10	134	165	45
5	0	156	-	45
6	0	-	-	-
Média	3,33	105,6	208,25	66,4
DP	5,16	62,12	38,48	47,46

ANEXO T - Valores séricos da interleucina 6 (IL-6).

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	0	441	484	323
2	0	729	451	383
3	66	569	1431	853
4	0	561	930	1304
5	34	1121	-	1034
6	0	-	-	-
Média	16,67	684,2	824	779,4
DP	27,73	264,76	459,86	421,57

ANEXO U - Valores séricos da interleucina 10 (IL-10).

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	33	175	204	279
2	37	402	258	258
3	0	255	147	261
4	38	121	275	375
5	0	247	-	309
6	0	-	-	-
Média	18	240	221	296,40
DP	19,79	105,95	57,88	48,39

ANEXO V - Valores séricos de creatinina.

Rato	SHAM	STO	SE30	SECO
1	0,6	0,5	0,5	0,8
2	0,4	0,6	0,7	0,8
3	0,2	0,6	0,6	1
4	0,4	0,6	0,5	1
5	0,8	0,3	0,8	0,8
6	0,5	0,6	0,6	0,9
7	0,5	0,4	0,3	0,7
8	0,3	0,4	0,5	0,9
9	0,3	0,7	0,3	0,6
10	0,4	0,4	0,8	0,7
11	0,4	0,8	0,5	0,6
12	0,4	0,6	0,4	0,6
13	-	0,8	0,7	0,7
Média	0,43	0,56	0,55	0,78
DP	0,16	0,16	0,17	0,14

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B and Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks - a review. *Liver Transpl.* 2010 Sep;16(9):1016-32.
2. De GH, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc.* 2007 Mar;39(2):481-4.
3. Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2003;10(3):195-9.
4. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005 May;37(4):1653-6.
5. Rushing GD, Britt LD. Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. *Ann Surg.* 2008 Jun;247(6):929-37.
6. Birrer R, Takuda Y, Takara T. Hypoxic hepatopathy: pathophysiology and prognosis. *Intern Med.* 2007;46(14):1063-70.
7. Takeuchi D, Yoshidome H, Kurosawa H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M. Interleukin-18 exacerbates pulmonary injury after hepatic ischemia/reperfusion in mice. *J Surg Res.* 2010 Jan;158(1):87-93.
8. Weinbroum AA, Kidron A, Hochhauser E, Hochman A, Rudick V, Vidne BA. Liver glutathione level influences myocardial reperfusion injury following liver ischemia-reperfusion. *Med Sci Monit.* 2001 Nov-Dec;7(6):1137-44.
9. Behrends M, Hirose R, Park YH, Tan V, Dang K, Xu F, Park SH, Niemann CU. Remote renal injury following partial hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Gastrointest Surg.* 2008 Mar;12(3):490-5.

10. Weinbroum AA. N-acetyl-L-cysteine mitigates aortic tone injury following liver ischemia-reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 Jun;45(6):509-15.
11. Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl.* 2007 Mar;13(3):382-90.
12. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, naya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2009 Jan-Feb;22(1):46-55.
13. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2008 Jun 1;147(1):153-9.
14. Caban A, Oczkowicz G, bdel-Samad O, Cierpka L. Influence of Kupffer cells on the early phase of liver reperfusion. *Transplant Proc.* 2002 Mar;34(2):694-7.
15. Llacuna L, Mari M, Lluís JM, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. Reactive oxygen species mediate liver injury through parenchymal nuclear factor-kappaB inactivation in prolonged ischemia/reperfusion. *Am J Pathol.* 2009 May;174(5):1776-85.
16. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001;33:100-113.
17. Nakano Y, Kondo T, Matsuo R, Hashimoto I, Kawasaki T, Kohno K, Myronovych A, Tadano S, Hisakura K, Ikeda O, Watanabe M, Murata S, Fukunaga K, Ohkohchi N. Platelet dynamics in the early phase of postischemic liver in vivo. *J Surg Res.* 2008 Oct;149(2):192-8.

18. Caldwell CC, Tschoep J, Lentsch AB. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol.* 2007 Sep;82(3):457-64.
19. Kuboki S, Sakai N, Tschop J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 May;296(5):G1054-9.
20. Belous A, Knox C, Nicoud IB, Pierce J, Anderson C, Pinson CW, Chari RS. Reversed activity of mitochondrial adenine nucleotide translocator in ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 2003;75:1717-23.
21. Brock RW, Nie RG, Harris KA, Potter RF. Kupffer cell-initiated remote hepatic injury following bilateral hind-limb ischemia is complement dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Feb;280(2):G279-84.
22. Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2004 Jan;116(1):81-90.
23. Arii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2003;10(3):189-94.
24. 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 Jun;11(6):663-8.
25. Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg.* 2003 Dec;238(6):843-50.

26. Herman P, Perini MV, Coelho F, Saad W, D'Albuquerque LA. Half-pringle maneuver: a useful tool in laparoscopic liver resection. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2010 Feb;20(1):35-7.
27. Canedo LF, Machado MA, Coelho AM, Sampietre SN, Bacchella T, Machado MC. 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 Jul-Sep;44(3):276-81.
28. Figueira ER, Bacchella T, Coelho AM, Sampietre SN, Molan NA, Leitão RM, Machado MC. Timing-dependent protection of hypertonic saline solution administration in experimental liver ischemia/reperfusion injury. *Surgery*. 2010 Mar;147(3):415-23.
29. 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 Oct;15(10):1679-88.
30. Andraus W, Souza GF, Oliveira MG, Haddad LB, Coelho AM, Galvão FH, Leitão RM, D'Albuquerque LA, Machado MC. S-nitroso-N-acetylcysteine ameliorates ischemia-reperfusion injury in the steatotic liver. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010 Jul;65(7):715-21.
31. Santos VR. *Isquemia-reperfusão hepática em ratos: efeitos da administração endovenosa da solução salina hipertônica a 7,5% associada a pentoxifilina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.
32. Theodoraki K, Tympa A, Karmaniolou I, Tsaroucha A, Arkadopoulos N, Smyrniotis V. Ischemia/reperfusion injury in liver resection: A review of preconditioning methods. *Surg Today*. 2011 May;41(5):620-9.

33. Heaney A, Buggy DJ. Can anaesthetic and analgesic techniques affect cancer recurrence or metastasis? *Br J Anaesth*. 2012 Dec;109 Suppl 1:i17-8.
34. Hirayama F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. *Br J Haematol*. 2013 Feb;160(4):434-44.
35. Hajjar LA, Vincent JL, Galas FR, Nakamura RE, Silva CM, Santos MH, Fukushima J, Kalil Filho R, Sierra DB, Lopes NH, Mauad T, Roquim AC, Sundin MR, Leão WC, Almeida JP, Pomerantzeff PM, Dallan LO, Jatene FB, Stolf NA, Auler JO Jr. Transfusion requirements after cardiac surgery: the TRACS randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Oct 13;304(14):1559-67.
36. Lango R, Mrozinski P. Clinical Importance of anaesthetic preconditioning. *Anestezjol Intens Ter*. 2010 Oct-Dec;42(4):206-12.
37. Delgado-Herrera L, Ostroff RD, Rogers SA. Sevoflurane: approaching the ideal inhalational anesthetic: a pharmacologic, pharmacoeconomic, and clinical review. *CNS Drug Rev*. 2001 Spring;7(1):48-120.
38. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth*. 2003 Oct;91(4):551-65.
39. Zaugg M, Lucchinetti E, Garcia C, Pasch T, Spahn DR, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Clinical implications. *Br J Anaesth*. 2003 Oct;91(4):566-76.
40. Casanova J, Garutti I, Simon C, Giraldez A, Martin B, Gonzalez G, Azcarate L, Garcia C, Vara E. The effects of anesthetic preconditioning with sevoflurane in an experimental lung autotransplant model in pigs. *Anesth Analg*. 2011 Oct;113(4):742-8.

41. Ye R, Yang Q, Kong X, Li N, Zhang Y, Han J, Xiong L, Liu X, Zhao G. Sevoflurane preconditioning improves mitochondrial function and long-term neurologic sequelae after transient cerebral ischemia: role of mitochondrial permeability transition. *Crit Care Med*. 2012 Sep;40(9):2685-93.
42. Szabadfi K, Danyadi B, Kiss P, Manayalan S, Gabriel R, Reglodi D, Tamas A, Trasy D, Batai I. Preconditioning with volatile anaesthetic in ischemic retinal lesion in rats. *J Mol Histol*. 2012 Oct;43(5):565-9.
43. Bedirli N, Ofluoglu E, Kerem M, Utebey G, Alper M, Yilmazer D, Bedirli A, Ozlu O, Pasaoglu H. Hepatic energy metabolism and the differential protective effects of sevoflurane and isoflurane anesthesia in a rat hepatic ischemia-reperfusion injury model. *Anesth Analg*. 2008 Mar;106(3):830-7.
44. Zhou SP, Jiang P, Liu L, Liu H. Protective effect of sevoflurane on hepatic ischaemia/reperfusion injury in the rat: A dose-reponse study. *Eur J Anaesthesiol*. 2013 Oct;30(10): 612-7.
45. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, Jochum W, Spahn DR, Graf R, Clavien PA. A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann Surg*. 2008 Dec;248(6):909-18.
46. Minou AF, Dzyadzko AM, Shcherba AE, Rummo OO. The influence of pharmacological preconditioning with sevoflurane on incidence of early allograft dysfunction in liver transplant recipients. *Anesthesiol Res Pract*. 2012;2012:930487.
47. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Bonvini JM, Lesurtel M, Ganter M, Weber A, Puhan MA, Clavien PA. Protection of pharmacological postconditioning in liver surgery: results of a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg*. 2012 Nov;256(5):837-44.

48. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg*. 1998 Dec;85(12):1636-40.
49. Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg*. 2006 Jul;244(1):89-98.
50. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg*. 2006 Mar-Apr;19(2):113-23.
51. 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 Aug;30(8):947-53.
52. Estabrook R, Pullman M. Oxidation and phosphorylation. In: Estabrook RW, Pullman ME, editors. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press; 1967.
53. Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*. 1955 Jun 25;175(4469):1120-1.
54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
55. 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 Apr;17(4):286-92.
56. Quireze C, Montero EF, Leitao 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 Jul-Aug;19(4):229-36.
57. 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 May;35(5):757-70.

58. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985 Dec;59(6):1978-85.
59. 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.
60. Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery*. 2nd Edition. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, 2005.
61. Brunner E, Puri ML. *Nonparametric methods in factorial designs. Statistical papers*. 2001;42:1-52.
62. 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.
63. 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.
64. Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(2):202-12.
65. Kohro S, Hogan QH, Nakae Y, Yamakage M, Bosnjak ZJ. Anesthetic effects on mitochondrial ATP-sensitive K channel. *Anesthesiology*. 2001 Dec;95(6):1435-340.
66. Adamczyk S, Robin E, Simerabet M, Kipnis E, Tavernier B, Vallet B, Bordet R, Lebuffe G. Sevoflurane pre- and post-conditioning protect the brain via the mitochondrial K ATP channel. *Br J Anaesth*. 2010 Feb;104(2):191-200.

67. Novalija E, Kevin LG, Eells JT, Henry MM, Stowe DF. Anesthetic preconditioning improves adenosine triphosphate synthesis and reduces reactive oxygen species formation in mitochondria after ischemia by a redox dependent mechanism. *Anesthesiology*. 2003 May;98(5):1155-63.
68. Assad AR, Delou JM, Fonseca LM, Villela NR, Nascimento JH, Verçosa N, Lopes AG, Capella MA. The role of KATP channels on propofol preconditioning in a cellular model of renal ischemia-reperfusion. *Anesth Analg*. 2009 Nov;109(5):1486-92.
69. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(1):15-26.
70. El-Wahsh M, Seifalian AM, Fuller BJ, Rolles K, Davidson BR. Induction of adhesion molecule expression in liver ischaemia-reperfusion injury is associated with impaired hepatic parenchymal microcirculation. *Br J Surg*. 2004;91(8):1034-9.
71. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology*. 1999;30(1):203-8.
72. Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, Sampietre SN, Molan NA, 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 Jan;32(1):80-6.
73. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg*. 2000;191(6):650-6.
74. Han J, Kim N, Joo H, Kim E. Ketamine abolishes ischemic preconditioning through inhibition of K(ATP) channels in rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jul;283(1):H13-21.

75. Ko SH, Lee SK, Han YJ, Choe H, Kwak YG, Chae SW, Cho KP, Song HS. Blockade of myocardial ATP-sensitive potassium channels by ketamine. *Anesthesiology*. 1997 Jul;87(1):68-74.