

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA

ANESTÉSICOS INALATÓRIOS E SEU EFEITO SOBRE O
DANO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO:
COMPARAÇÃO ENTRE ISOFLURANO E SEVOFLURANO
EM MODELO EXPERIMENTAL EM FÍGADO DE RATOS

Silué Zanetti Franzoni Dal Molin

Porto Alegre, 2005

ANESTÉSICOS INALATÓRIOS E SEU EFEITO SOBRE O
DANO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO:
COMPARAÇÃO ENTRE ISOFLURANO E SEVOFLURANO
EM MODELO EXPERIMENTAL EM FÍGADO DE RATOS

Silvê Zanetti Franzoni Dal Molin

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Gastroenterologia

Porto Alegre, 2005

D148a Dal Molin, Siluê Zanetti Franzoni

Anestésicos inalatórios e seu efeito sobre o dano de isquemia e reperfusão : comparação entre isoflurano e sevoflurano em modelo experimental em fígado de ratos. / Siluê Zanetti Franzoni dal Molin ; orient. Mário Reis Álvares-da-Silva; co-orient. Maria Beatriz Cardoso Ferreira. – 2005.

72 f. : il. col.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Isoflurano 2. Anestésicos inalatórios 3. Fígado 4. Isquemia
I. Título II. Álvares-da-Silva, Mário Reis III Ferreira, Maria Beatriz Cardoso

NLM: WI 700

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

**O pessimista se queixa do vento,
O otimista espera que ele mude
E o realista ajusta as velas.**

Willian Ward

Dedicatória

Este trabalho é dedicado:

Ao Fábio, pelo amor, paciência e pelo exemplo de busca ao conhecimento e, por que não dizer, também, na busca da perfeição.

Ao meu pai, por não ter tido a oportunidade de estar mais entre nós e não saber o quanto seus filhos ainda poderiam orgulhá-lo.

À Dra Helena, pela determinação, uma pessoa incansável na reestruturação do Serviço de Anestesia do HCPA.

Agradecimentos Especiais

*Ao **Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva**, meu orientador e colega de grupo de transplante hepático. Pelo incentivo, presença e oportunidade de fazer este Mestrado.*

*A **Prof Dra Maria Beatriz Cardoso Ferreira**, minha co-orientadora, por ter me aceito e ter me dado grandes lições com sua experiência e exigência no campo da pesquisa.*

*À **Raquel Scherer Fraga**, pelo exemplo de coleguismo.*

*Ao **Cleber Rosito Pinto Krueel**, pela sua inesgotável paciência e pela busca constante dos limites da ciência e de seus limites.*

Agradecimentos

Ao **Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia**, pela oportunidade do aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski**, pela análise histológica.

À **Prof. Dra. Roseli de Oliveira Möllerke**, pelo seu entusiasmo e pelas sugestões fornecidas.

A **Daniela Benzano**, a qual, por várias vezes, refez a estatística deste trabalho.

À **Prof. Carmen Pilla**, pela realização das análises bioquímicas.

Ao meu colega de Mestrado e veterinário da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, **Marcos Eugênio Soares Duarte**, pela sua dedicação, auxílio e paciência.

À **Equipe do Laboratório de Biofísica da PUCRS**, especialmente ao **Eduardo Caberlon**, ao **José Mateus Pra Guaragna**, à **Catherine Stragliotto Isoppo**, à **Carolina Maria Alves Bastos** e à **Paula Elisa Tischler Heinen**, pelas inúmeras horas dispensadas a este estudo, além da dedicação e disponibilidade demonstradas.

Aos meus colegas de Mestrado **Gabriel Barlem e Stela Maria Motta**, colegas de grupo que transformaram os momentos de trabalho em descontração, e outros colegas, mais especificamente os das aulas de Seminário de Pesquisa, com os quais fiz novas amizades.

Aos acadêmicos de Medicina, **Glauber Gasperin e Luciana Harlacher**, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e coleta de material.

*Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, **Sra. Moema Vianna Goulart e Sra. Jamile da Silva Ladeira**, pela competência, dedicação e carinho dispensados.*

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta tese e que, involuntariamente, deixaram de ser nominadas.

*E a **Deus**, por ter colocado todas estas pessoas no meu caminho.*

Sumário

Lista de abreviaturas **10**

Lista de tabelas **12**

Lista de figuras **13**

Resumo **14**

1. Introdução **15**

1.1. Os anestésicos inalatórios **15**

1.2. O estado atual do transplante de fígado **18**

1.3. O dano de isquemia/reperfusão e o estresse oxidativo **20**

2. Justificativa **24**

3. Objetivos **25**

3.1. Objetivo geral **25**

3.2. Objetivos específicos **25**

4. Materiais e métodos **27**

4.1. Animais de experimentação **27**

4.2. Desenho do estudo **27**

4.2.1. Estudo 1 **28**

4.2.1.1. Desenho experimental **28**

4.2.1.2. Avaliação bioquímica e histopatológica **28**

4.2.2. Estudo 2 **29**

4.2.2.1. Desenho experimental **29**

4.2.2.2. Procedimentos **30**

4.2.2.2.1. Primeira etapa – Retirada do fígado **30**

4.2.2.2.2. Segunda etapa – Preservação do fígado **31**

4.2.2.2.3. Terceira etapa – Preparo cirúrgico para o transplante hepático **31**

4.2.2.2.4. Quarta etapa – Transplante e reperfusão **32**

4.2.2.2.5. Quinta etapa – Avaliação da isquemia/reperfusão(I/R) e estresse oxidativo (EO) **33**

4.2.2.2.6. Sexta etapa – Análise histopatológica **35**

4.3. Tamanho da amostra **35**

4.4. Análise estatística	35
4.5. Aspectos éticos	36
4.6. Financiamento	37
5. Resultados	38
5.1. Estudo 1	38
5.2. Estudo 2	40
5.2.1. Fase de preservação do fígado ou de isquemia a frio	40
5.2.2. Fase de reperfusão hepática ou de isquemia a quente	44
5.3. Análise histopatológica	46
6. Discussão	49
7. Conclusão	61
Referências Bibliográficas	62
Anexos	
Anexo 1. Fluxograma do Estudo 1	69
Anexo 2 Fluxograma do Estudo 2	70
Anexo 3 Protocolo para análise da biópsia de reperfusão	71

Lista de Abreviaturas

ABTO: Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos

AEEH: *Asociación Española para El Estudio del Hígado*

AI: anestésicos inalatórios

ALT: aspartato aminotransferase

AST: alanina aminotransferase

ATP: trifosfato de adenosina

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CK: células de Kupffer

CIOMS: *Council for International Organizations of Medical Sciences*

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

DNA: ácido desoxirribonucléico

EO: estresse oxidativo

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO: espécies reativas de oxigênio

FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

GPx: glutathiona peroxidase

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: hematoxilina-eosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IASP: *International Association for the Study of Pain*

ILAR: *Institute for Laboratory Animal Research*

I/R: dano de isquemia/reperfusão

LDH: lactato desidrogenase

LPO: lipoperoxidação

MDA: malondialdeído

NADPH: fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida

NO: óxido nítrico

NO_2^- : nitrito

NO_3^- : nitrato

NOS: óxido nítrico sintetase

O_2^- : ânion superóxido

OH^\cdot : radical hidroxil

ONOO^- : peroxinitrito

ONT: *Organización Nacional de Trasplantes*

RL: radicais livres

SOD: superóxido dismutase

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TxH: transplante hepático

UEO: Unidade de Experimentação Animal

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNESCO: *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*

UNOS: *United Network for Organ Sharing*

UW: solução da Universidade de Wisconsin

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores das enzimas AST, ALT e LDH no soro de ratos controles ou anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. **38**

Tabela 2: Valores de TBARS em soro e fígado de animais controles ou submetidos à anestesia com isoflurano e sevoflurano. **39**

Tabela 3: Frequência absoluta de alterações histológicas encontradas no tecido hepático de animais controles ou submetidos à anestesia com isoflurano e sevoflurano. **40**

Tabela 4: Dosagem sérica de AST, ALT e LDH, após transplante e reperfusão do fígado. **44**

Tabela 5: Dosagem de malondialdeído, por meio do método de TBARS, em soro e tecido hepático, após reperfusão hepática. **45**

Tabela 6: Valores séricos de catalase e produtos do óxido nítrico (NO) de animais submetidos a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano ou sevoflurano. **46**

Lista de Figuras

Figuras 1. Modelo de reperfusão hepática. **13**

Figura 1. Valores de lactato desidrogenase (LDH), obtidos no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio, nos Grupos 1 e 2. **41**

Figura 2: Valores AST obtidos no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio, nos Grupos 1 e 2. **42**

Figura 3. Valores de ALT obtidos no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio, nos Grupos 1 e 2. **43**

Figura 4. Tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (40 X aumento) obtido de animal submetido a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano. **47**

Figura 5. Tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (100 X aumento) obtido de animal submetido a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano. **48**

Resumo

A proteção do tecido hepático pelos anestésicos inalatórios (AI) ainda é motivo de discussão. Muitos estudos sugerem efeito protetor, mas poucos comparam o isoflurano e sevoflurano. Com o objetivo de comparar os efeitos destes anestésicos sobre a lesão de isquemia/reperfusão (I/R) hepática, foi conduzido um estudo experimental em ratos Wistar, adultos, machos. O experimento foi dividido em dois estudos. No Estudo 1 foram avaliados 27 ratos divididos em 3 grupos: grupo 1 (anestesiados por 1 hora com isoflurano), grupo 2 (anestesiados com sevoflurano), grupo 3 (ratos controles, decapitados). No Estudo 2 foram incluídos 20 ratos divididos em 4 grupos: grupo A (doador e anestesiado com isoflurano) e C (doador e anestesiado com sevoflurano) – e grupo B (receptor e anestesiado com isoflurano) e D (receptor e anestesiado com sevoflurano).

O fígado retirado dos grupos A e C foi perfundido com solução de preservação e mantido em solução por 6 horas. Foram realizadas dosagens de AST, ALT e LDH no líquido de preservação em 2, 4 e 6 h de isquemia a frio. Após 6 h, o fígado preservado foi perfundido por 15 min através de um modelo experimental de reperfusão hepática. Após este período, foi interrompido o sistema de reperfusão, sendo coletadas amostras de sangue do efluente venoso para determinação de AST, ALT, LDH e TBARS. Foram também seccionados fragmentos do fígado para análise histopatológica, dosagem de TBARS, catalase, derivados do NO.

Dessa forma, no Estudo 1 não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos quando analisadas aminotransferases e LDH. Porém, ao ser avaliado o estresse oxidativo (EO) pelo método de TBARS, foi encontrado uma diminuição do malondialdeído (MDO) sérico com os dois anestésicos. No Estudo 2, o sevoflurano apresentou uma liberação menor de aminotransferases e LDH no líquido de preservação a frio, em 6 horas, e após a reperfusão mostrou um aumento na produção de óxido nítrico no fígado e uma diminuição na lipoperoxidação no soro, quando comparado ao isoflurano.

1. Introdução

1.1. Os anestésicos inalatórios

Os anestésicos inalatórios (AI) tiveram a primeira descrição clínica para uso em anestesia geral em torno de 1850. Um dos primeiros agentes empregados foi o clorofórmio. Sua ação foi descrita como sendo “envenenamento”, e a ele foi atribuída grave toxicidade hepática e renal. Nos anos seguintes, os AI foram investigados e estudados intensamente, e hoje são amplamente empregados na prática anestésica. Sabe-se que a maioria dos mecanismos pelos quais os AI provocam seus efeitos tóxicos envolve seus metabólitos, que são produtos da biotransformação mediada pelo citocromo P-450 (Kenna, 1995). Os AI atualmente usados são o halotano, o enflurano, o isoflurano ($\text{CHF}_2\text{-O-CHCl-CF}_3$) e o sevoflurano ($\text{CH}_2\text{F-O-CH-(CF}_3)_2$).

Isoflurano e sevoflurano são anestésicos administrados por via respiratória nas fases de indução e manutenção da anestesia geral. Em baixas doses, induzem hipnose, analgesia, amnésia, euforia, excitação e hiper-reflexia. Com concentrações mais altas, promovem sedação profunda, relaxamento muscular e redução das respostas motoras e autonômicas ao estímulo nocivo (Ferreira, 2004).

Os AI são metabolizados primariamente no fígado, mas também o são em outros tecidos, como rins e pulmões. O isoflurano é submetido à oxidação do alfa-carbono, provavelmente pelo citocromo P-450 2E1 e 3A. O sevoflurano é metabolizado da mesma forma (Miller, 2000).

O mais importante mecanismo de toxicidade dos fármacos é a produção de reações intermediárias durante o seu metabolismo. Estas ocorrem, em geral, durante a fase 1 do metabolismo. Os radicais livres são gerados durante o curso normal do metabolismo celular (citocromo P-450).

Os AI são fortemente lipofílicos, e o dano das suas reações intermediárias podem ocorrer em decorrência do ataque aos ácidos graxos poliinsaturados,

presentes nas membranas plasmáticas, pelas espécies reativas do oxigênio (ERO) produzidas durante a biotransformação desses agentes.

A biotransformação hepática dos AI produz flúor inorgânico e hexafluorisopropanol, que têm potencial nefrotóxico e hepatotóxico. Estes metabólitos são rapidamente conjugados em glucoronida não-tóxica, além de formarem fluormetil 2,2-difluor-1-[trifluormetil]vinil éter, que, em contato com dióxido de carbono, eleva os níveis séricos de nitrogênio uréico e creatinina (Darling, 1997; Ebert, 1998; Nishiyama, 1998; Mazze, 2000).

No fígado, monoxigenases, como a isoforma P-450 2E1, possuem alta atividade de NADPH-oxidase, por meio da qual espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Conseqüentemente, podem induzir lipoperoxidação (LPO) potencialmente lesiva (Lucena, 2004).

O retículo endoplasmático dos hepatócitos é a estrutura envolvida no metabolismo de fármacos. Esta matriz membranosa de lipoproteínas é o maior local de síntese de proteínas e transferência de elétrons, assim como o principal sítio do metabolismo de lipídios, fármacos e hormônios. O metabolismo requer a interação do substrato, no caso o fármaco, com a enzima. A enzima catalisa reações e libera um produto diferente, chamado metabólito (Miller, 2000).

O modelo de metabolismo dos fármacos é comum para toda a espécie animal. Ele é bifásico. Na primeira fase, a de biotransformação, há oxidação (hidroxilação), hidrólise ou redução de lipídios solúveis ou substâncias não-polares. Esta fase ocorre principalmente no retículo endoplasmático. A segunda fase, a de síntese, consiste na conjugação do fármaco ou de seus metabólitos com componentes endógenos, ocorrendo especialmente no citoplasma. O resultado final é a excreção do fármaco por via biliar ou urinária (Miller, 2000).

Quando se analisa especificamente os AI, a primeira fase corresponde àquela que envolve enzimas do citocromo P-450. As reações de oxidação são as mais comuns. Estas enzimas compõem um sistema múltiplo, sendo que as isoenzimas responsáveis pelo metabolismo, tanto do isoflurano quanto do sevoflurano, são especificamente aquelas do citocromo P-4502E1, localizadas no

principal sítio de metabolização do fármaco pelo fígado, que são os hepatócitos perivenulares.

As reações da segunda fase são reações de conjugação. Elas ocorrem quando o fármaco é conjugado a um componente endógeno, como, por exemplo, a glicina, formando um produto polar, solúvel em água, pronto para ser excretado (Miller, 2000).

Os AI chegam por via respiratória até a intimidade do parênquima pulmonar. Na unidade alvéolo-capilar, vão se processar os mecanismos que culminam na passagem dos anestésicos para a corrente sangüínea.

O isoflurano tem seu metabolismo resultante da oxidação do alfa-carbono pelo citocromo P-450 2E1 e 3A, estimado em 0,2%. Já em relação ao sevoflurano, entre 1 a 5% do montante distribuído pela circulação sangüínea é biotransformado (Miller, 2000).

O mais importante mecanismo da toxicidade dos fármacos é a produção de reações intermediárias durante o seu metabolismo, que podem ocorrer já durante a primeira fase. Os radicais livres (RL) são gerados durante o curso normal do metabolismo celular, assim como em situações em que há lesão tecidual.

Tem sido sugerido nos últimos anos que haja um efeito protetor dos anestésicos voláteis halogenados, em procedimentos de isquemia/reperfusão. Autores, como Nielsen (1997), Nishiyama (1998a) e Jung (1999), vêm estudando os efeitos da isquemia/reperfusão em variados órgãos, como cérebro, coração, pulmão e rim, e sugerem um efeito protetor daqueles agentes. Talvez isto se deva à preservação dos níveis de ATP durante a isquemia, à redução da adesão de neutrófilos polimorfonucleares, ao aumento da produção de óxido nítrico (NO), bem como à inibição da produção de RL e à redução da liberação de cálcio (Ischida *et al*, 1997). Heindl *et al* (1999) demonstraram que ambos, o isoflurano e o sevoflurano, reduzem a adesão de neutrófilos polimorfonucleares na reperfusão coronariana, preservando a função cardíaca. Preckel *et al* (1998) e Schalack *et al* (1998), em investigações *in vivo* e *in vitro*, sugerem um efeito protetor do sevoflurano superior ao do isoflurano na lesão de reperfusão do miocárdio.

A proteção do tecido hepático pelos AI ainda é motivo de discussão. Já foi descrito que o isoflurano, em hepatócitos isolados, durante um desafio anóxico, atuaria como agente poupador de energia. O sevoflurano, por sua vez, também pode proteger o fígado, agindo principalmente durante a fase de reperfusão (Kon, Shinpei MD, 1997).

Muitos são os estudos *in vivo* e *in vitro* que sugerem um efeito protetor dos AI em isquemia/reperfusão de órgãos (Heindl *et al*, 1999), mas poucos compararam sevoflurano e isoflurano. Imai *et al* (1996) relatam que o isoflurano teria efeito protetor de igual magnitude ao do sevoflurano em modelo de isquemia/reperfusão normotérmica de fígados de ratos. Ischida *et al* (1997), em experimento *in vivo* com fígados de porcos, não observaram diferença significativa entre sevoflurano e isoflurano, após 240 min de reperfusão normotérmica, indicando que os dois agentes teriam similar efeito nesse tipo de lesão.

1.2. O estado atual do transplante de fígado

O transplante é atualmente o tratamento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves do fígado (Langnas & Howard, 1996; Wiesner, 1996; Busuttill *et al*, 2005; Julapalli *et al*, 2005; McCormick & Sultan, 2005; Morika *et al*, 2005; Otte *et al*, 2005). Seus bons resultados permitiram que fosse ofertado mais precocemente no curso da doença hepática avançada, deixando de ser apenas um ato terapêutico final, realizado em condições desesperadoras.

Em todo o mundo, apesar do aumento no número de transplantes hepáticos (TxH) realizados, houve um crescimento ainda maior na lista de espera, com conseqüente acréscimo na mortalidade em lista (UNOS, 2004; ABTO, 2004). O principal fator a limitar o número de pacientes beneficiados com transplantes em todo o mundo é a escassez de órgãos (Norman, 1997; Bosch, 1999; Jiménez-Romero *et al*, 1999; Melendez & Heaton, 1999; McMaster & Vadeyar, 2000; Sette *et al*, 2000). Mesmo na Espanha, país onde o modelo de captação é considerado o mais eficiente do mundo, o tempo de espera em lista tem aumentado consideravelmente (AEEH, 2005; ONT, 2005). No Brasil isto não é diferente.

Segundo dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), foram realizados, no ano de 2004, 928 TxH, enquanto o número de pacientes listados é três vezes maior (ABTO, 2005).

A consequência natural da pouca oferta é a tendência à aceitação de órgãos provindos dos chamados doadores marginais, indivíduos com condições hemodinâmicas limítrofes, idade avançada, comorbidades ou presença de infiltração gordurosa significativa. Essa conduta expande as fronteiras dos doadores aceitos e tende a aumentar o número de transplantes efetivamente realizados, mas expõe os receptores a riscos ainda não conhecidos ou adequadamente documentados por estudos clínicos (De Carlis *et al*, 1996; Jiménez-Romero *et al*, 1999; Melendez & Heaton, 1999; Mirza *et al*, 1999).

Obrigatoriamente a realização de um transplante de fígado envolve o surgimento, em maior ou menor intensidade, de isquemia tecidual. A redução da oxigenação pode atingir o enxerto em diferentes fases do processo de troca do órgão doente pelo sadio (Carrasco *et al*, 1996; Shackleton, 1998). Acredita-se que virtualmente todos os enxertos sejam danificados durante o transplante (Gaffey *et al*, 1997; Wang *et al*, 1998; Cohen *et al*, 2000). Dá-se o nome de dano de preservação ou dano de isquemia/reperfusão (I/R) aos fenômenos nocivos secundários àquele processo, englobando aqueles decorrentes de condições pré-mórbidas do doador, de isquemia a quente do órgão antes e durante a sua retirada e de adequação da preservação, bem como aqueles provindos do estoque a frio. Outros fatores que podem contribuir para o dano são os provenientes da vascularização e do ambiente pessoal do receptor (Gaffey *et al*, 1997; Rosen & Martin, 1999).

A afirmativa é recente: “o avanço do transplante hepático hoje depende mais propriamente dos progressos na preservação de órgãos que das técnicas cirúrgicas e de imunossupressão” (Hirokawa *et al*, 2002). Em outras palavras, estratégias que possam melhorar a qualidade do enxerto são bem-vindas, especialmente quando se considera o cenário atual de utilização de órgãos provindos de doadores marginais.

1.3. O dano de isquemia/reperfusão e o estresse oxidativo

O processo I/R resulta tanto da isquemia quanto da reintrodução do fluxo sanguíneo, no denominado “paradoxo do oxigênio” (Minor & Isselhard, 1995; Post *et al*, 1995; Arora & Gores, 1996). A manutenção inicial da isquemia e a geração de ERO desempenham papel determinante na gênese da lesão de reperfusão (Minor & Isselhard, 1995). Durante a isquemia a frio, há acúmulo de hipoxantina, e o principal mecanismo envolvido na gênese de oxirradicais nas situações de isquemia/reperfusão é aquele relacionado à atividade da enzima xantina-oxidase (Takemoto *et al*, 1994; Nicolli *et al*, 1995; Petrowsky *et al*, 1995; Willet *et al*, 1995; Chavez-Cartaya *et al*, 1996; Bach *et al*, 1996; Rhoden, 1998; Shackleton, 1998).

Apesar de o fenômeno da toxicidade do oxigênio ser conhecido desde o final do século XIX, a presença de RL em materiais biológicos foi identificada há apenas 50 anos (Belló-Klein, 2002). O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de ERO (ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)), espécies reativas de nitrogênio (ERN) (óxido nítrico (ON), suas formas estáveis, o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-)) (Cadmium, 2002) e do sistema de defesa de antioxidantes endógenos, que protegem a integridade e a função celular (Burke *et al*, 2002).

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes, retardam ou inibem a oxidação. Podem ser de dois tipos principais, os enzimáticos e não-enzimáticos. As defesas antioxidantes enzimáticas são constituídas por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx). As defesas antioxidantes não-enzimáticas compreendem as substâncias exógenas que atuam como antioxidantes, entre elas as vitaminas, os beta-carotenos e os flavonóides.

As células de Kupffer (CK) são células do sistema monócito-fagócito localizadas nos sinusóides hepáticos e que perfazem 85% do total dos macrófagos corporais. Quando ativadas, influem na resposta inflamatória com a produção de citocinas (Crawford, 1999). O estresse oxidativo (EO) promove a ativação de polimorfonucleares. A sua conseqüente interação com o endotélio leva à peroxidação lipídica e à desintegração de membranas celulares, culminando em

perda da integridade endotelial e aumento da permeabilidade microvascular, com edema intersticial. A formação de oxirradicais, por fim, faz com que sejam liberados mediadores de inflamação, como citocinas e fator de agregação plaquetária, e estes induzem a atividade de moléculas de adesão celular (Minor & Isselhard, 1995).

Os mecanismos pelos quais as células são atacadas pelas ERO são muito complexos e ainda não estão perfeitamente claros. A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de ERO, que é contrabalançada pelo seu consumo por meio de defesas antioxidantes não-enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou o organismo se encontra sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos (Belló-Klein, 2002; Busquets *et al*, 2002).

Mc Cord, em 1985, lançou a teoria de que os RL eram os promotores do dano de reperfusão. Segundo alguns autores, a mitocôndria seria o principal sítio gerador de superóxido, uma ERO, durante a reperfusão, pois durante a isquemia a cadeia respiratória está reduzida (Teoh & Farrell, 2003). Além disso, a geração de ERO durante I/R pode também ocorrer por meio da atividade da óxido nítrico sintetase e do metabolismo do ácido araquidônico (Belló-Klein, 2002).

A maior parte das substâncias químicas é metabolizada no fígado, onde o hepatócito é a célula em que o ataque dos radicais livres se faz com maior insistência e onde a produção dos peróxidos lipídicos ocorre como efeito da morte celular. Os radicais podem se unir e combinar seus elétrons sem par e se unir para formar uma união covalente, ou seja, uma união por compartilhamento de elétrons. Um radical pode doar ou receber elétrons. No primeiro caso, é dito um radical redutor, e, no segundo, um radical oxidante. Observou-se a geração dessas espécies em vários locais, como lisossomas, membrana plasmática, retículo endoplasmático, entre outros, sendo as mitocôndrias as maiores fontes *in vivo*.

Os danos celulares causados pelos radicais livres podem ser: a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), a inativação enzimática, a alteração do estado oxi-redox intracelular e o dano no DNA. A LPO tem sido freqüentemente estudada como um dos principais mecanismos de lesão celular provocada pelas ERO, sendo definida como uma oxidação de lipídios poliinsaturados (Buege & Aust, 1978).

A abordagem dos fenômenos associados à I/R contempla duas principais vias: a prevenção da formação de intermediários reativos de oxigênio, por meio de fármacos que interfiram nas rotas metabólicas envolvidas, e a eliminação desses agentes tóxicos imediatamente após a sua formação (Akimitsu *et al*, 1996; Arora & Gores, 1996; Rhoden *et al*, 1996; Ishida *et al*, 1997; Clavien, 1998; Uhlmann *et al*, 1998; Kondo *et al*, 1999; Almenara *et al*, 2000; Maggi *et al*, 2000; Net *et al*, 2000; Valentin *et al*, 2000).

A compreensão desse processo é essencial para o reconhecimento da importância das soluções de preservação. Uma boa solução de preservação de órgãos é aquela que tem a capacidade de atuar nos passos de geração de fenômenos tóxicos ao enxerto. A solução da Universidade de Wisconsin (UW) é a solução de preservação mais utilizada pelos grupos de transplantes hepáticos há mais de 10 anos, tendo substituído a solução EuroCollins, então a mais empregada. A composição da solução UW visa reduzir os efeitos negativos da hipotermia, combatendo o edema celular intersticial e a acidose, fornecer antioxidantes, inibindo intermediários reativos de oxigênio, e prover substrato para a repleção de ATP após a reperfusão (Southard & Belzer, 1996).

A aferição do dano de I/R habitualmente é feita por meio da determinação sangüínea da atividade das aminotransferases e de desidrogenase láctica (LDH). Outra forma de avaliação do dano é a atividade do fator V. Estes parâmetros são habitualmente utilizados na prática clínica no período pós-operatório dos pacientes submetidos a transplante hepático. Em ambiente de pesquisa, outros testes podem ser usados. Via de regra, em função da importância da geração de ERO na lesão de preservação, estes testes envolvem métodos que estimam o EO.

Conseqüentemente, a quantificação do EO torna-se importante para inferir o grau de disfunção hepática no período pós-operatório. Entretanto, isto só pode ser realizado de maneira indireta, uma vez que os RL são altamente reativos (Burke *et al*, 2002). Tendo grande instabilidade e meia-vida curta, não se deslocam para longe de seu sítio de formação, interagindo com qualquer biomolécula adjacente para se estabilizarem. Várias manifestações desse processo podem ser utilizadas na estimativa do grau de EO, como a LPO, feita indiretamente por meio do método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que quantifica o malondialdeído (MDA), a dosagem dos produtos do ON (nitrito e nitrato) e a quantificação de substâncias antioxidantes, como a catalase.

2. Justificativa do estudo

É clara a escassez de órgãos para transplante hepático nos dias de hoje. Isto faz com que haja um número cada vez maior de pacientes que necessitam do procedimento. A aceitação de órgãos providos de doadores marginais tem sido a estratégia habitualmente utilizada pelos grupos de transplante. Apesar dos avanços técnicos, cirúrgicos e anestésicos, bem como da imunossupressão, vários são os casos de ausência de funcionamento do órgão imediatamente após o transplante. Isto faz com que haja ainda um amplo campo de pesquisa na tentativa de melhorar as condições do enxerto e do receptor no período perioperatório.

Tem sido sugerido que os anestésicos inalatórios apresentam efeitos protetores na lesão de isquemia/reperfusão em vários órgãos. No entanto, os estudos que embasam essa sugestão, no que se refere a transplante de fígado, foram realizados com isquemia normotérmica. Assim, após busca na literatura, não há estudo que analise o papel protetor dos anestésicos inalatórios na reperfusão pós-isquemia a frio, que é a forma que simula o que ocorre na cirurgia para transplante hepático.

Ademais, há questões sobre as diferenças entre os diversos anestésicos inalatórios e sua capacidade hepatoprotetora em situações de isquemia e reperfusão. Na anestesia para o transplante hepático, o isoflurano é o agente mais utilizado, mas tem se voltado recentemente o interesse para outro agente inalatório, de custo superior, o sevoflurano.

Assim, a pesquisa a respeito da repercussão do uso de anestésicos gerais sobre a função hepática, especialmente em transplantes de fígado, é de grande interesse e esta permanece sendo uma área ainda a ser mais explorada. As questões sobre o papel hepatoprotetor dos anestésicos inalatórios, a comparação entre dois agentes de uso freqüente e sua influência na lesão de isquemia/reperfusão justificam e suportam este estudo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Comparar os efeitos de isoflurano e sevoflurano em modelo animal de isquemia a frio e reperfusão em fígado.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Estimar a lesão hepática induzida por isoflurano ou sevoflurano, por meio de parâmetros bioquímicos – dosagem de aspartato-aminotransferase (AST), alanino-aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH), comparando-se ratos controles àqueles submetidos à anestesia com isoflurano ou sevoflurano.

3.2.2. Avaliar lipoperoxidação, por meio de TBARS em sangue e tecido hepático, em ratos controles e submetidos à anestesia com isoflurano ou sevoflurano.

3.2.3. Analisar o padrão histológico hepático, verificando a ocorrência de lesão em fígados de ratos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano, em comparação a ratos controles.

3.2.4. Estimar lesão hepática pós-isquemia a frio, por meio de parâmetros bioquímicos (AST, ALT e LDH), comparando grupos de ratos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano.

3.2.5. Estimar lesão hepática pós-reperfusão, por meio de parâmetros bioquímicos (AST, ALT e LDH), em fígados de ratos submetidos à anestesia com um de dois anestésicos.

3.2.6. Avaliar lipoperoxidação, geração de espécies reativas de nitrogênio e defesas antioxidantes endógenas pós-reperfusão em fígados de ratos submetidos à anestesia com isoflurano ou sevoflurano.

3.2.7. Analisar, por meio de exame anatomopatológico, a ocorrência de lesão hepática pós-reperfusão em fígados de ratos submetidos à anestesia com isoflurano ou sevoflurano.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais de experimentação

Foi realizado um estudo experimental em ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso entre 300 e 450 g, procedentes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os animais foram mantidos em caixas-moradia individuais, confeccionadas em *plexiglass*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem, e submetidos a ciclo normal claro-escuro de 12 h, sendo alimentados *ad libitum* com ração padronizada para roedores e água.

Os grupos experimentais foram submetidos a uma distribuição aleatória em blocos de três animais. Cada bloco foi anestesiado ao mesmo tempo, com o mesmo anestésico. Os ratos que foram alocados no grupo controle foram submetidos aos procedimentos propostos, também em blocos de três.

Para a distribuição aleatória, os animais foram previamente imobilizados, envolvidos em tecido macio e marcados na cauda com uso de pincel atômico. A partir dessa numeração, foi feita a distribuição nos grupos, três a três.

4.2. Desenho do estudo

O estudo foi realizado em dois tempos, aqui denominados “Estudo 1” e “Estudo 2”.

Nos animais dos Estudos 1 e 2, foi procedida indução anestésica, respectivamente, com isoflurano a 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott) ou sevoflurano a 3,5% (Sevorane®, Laboratório Abbott), por via respiratória, com vaporizador calibrado.

4.2.1. Estudo 1 – Efeito da anestesia com isoflurano ou sevoflurano sobre parâmetros bioquímicos e histológicos em ratos submetidos a hepatectomia.

4.2.1.1. Desenho experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos, como descrito a seguir (Anexo 1).

Grupo 1 (isoflurano) – Os ratos foram anestesiados durante 1 hora com isoflurano a 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott), por via inalatória, em campânula de vidro transparente. A seguir, quando houve imobilidade e perda do reflexo de endireitamento, o animal foi colocado em decúbito ventral e imobilizado em mesa cirúrgica. Para controle das concentrações administradas de anestésico, foi empregado vaporizador calibrado. Ao final deste período, ainda anestesiados, foram feitos os seguintes procedimentos: incisão abdominal, isolamento, clampeamento e dissecação dos vasos hepáticos e retirada do fígado. Foram coletados 3 mL de sangue, por meio de punção cardíaca, para as seguintes dosagens: a) AST, b) ALT, c) LDH e d) análise da lipoperoxidação pelo método de TBARS. O fígado foi retirado, seccionado e enviado para análise histopatológica e avaliação do EO pelo método de TBARS.

Grupo 2 (sevoflurano) – Os ratos foram anestesiados com sevoflurano a 3,5% (Sevorane®, Laboratório Abbott), durante 1 hora. Foram feitos os mesmos procedimentos descritos no Grupo 1.

Grupo 3 (controle total) – Os ratos foram mortos por decapitação, em guilhotina. A seguir, foram igualmente submetidos aos procedimentos descritos para o Grupo 1, visando a coleta de sangue e tecido hepático.

4.2.1.2. Avaliação bioquímica e histopatológica

Ao final de 1 hora de anestesia, foi coletada amostra sangüínea para determinação de AST, ALT, LDH e TBARS. Foram seccionados fragmentos do fígado para dosagem de TBARS e análise histológica.

As dosagens de AST, ALT e LDH foram realizadas por meio de ensaio cinético, utilizando *kit* Liquiform®. Os valores foram expressos como UI/L.

Para a medida de TBARS do sangue coletado, soro foi obtido e aquecido com ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% e ácido tricloacético (TCA) a 10%, por 15 minutos em banho-maria, sendo a amostra posteriormente refrigerada e centrifugada. O produto corado foi quantificado por espectrofotometria, em 535 nm, por meio da técnica descrita por Bunge e Aust, em 1978. Os resultados foram expressos como nmol/mL.

A quantificação de TBARS no fragmento hepático foi realizada com a mesma técnica descrita para a dosagem no soro.

Para a análise histopatológica hepática, empregou-se a coloração de hematoxilina-eosina (HE). Foram retiradas duas amostras do fígado (lobos direito e esquerdo) que, a seguir, foram fixadas em formalina a 10%, incluídas em parafina e seccionadas a 3 µm. Posteriormente, os fragmentos foram montados sobre uma lâmina, fixados com xilol e corados. Todas as amostras anatomopatológicas codificadas foram analisadas pelo mesmo patologista, que desconhecia o grupo ao qual pertencia cada material. A avaliação das lâminas se deu em microscópio óptico, com aumentos de 40, 100 e 200X.

A lesão de preservação foi definida de acordo com critérios descritos por Gaffey *et al* (1997) (Anexo 3).

4.2.2. Estudo 2 – Efeito da anestesia com isoflurano ou sevoflurano sobre parâmetros bioquímicos e histológicos em modelo de transplante e reperfusão hepática.

4.2.2.1. Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme descrito a seguir (Anexo 2).

Grupo A (isoflurano) – Os ratos foram anestesiados com isoflurano a 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott), por via inalatória, em campânula de plástico transparente. A seguir, quando houve imobilidade e perda do reflexo de endireitamento, os animais foram colocados em decúbito ventral e imobilizados

em mesa cirúrgica. Para controle das concentrações administradas de anestésico, foi empregado vaporizador calibrado.

Grupo B (modelo de reperfusão com isoflurano) – Os fígados retirados dos animais incluídos no Grupo A foram transplantados nesse grupo de ratos e reperfundidos (Grupo B).

Grupo C (sevoflurano) – Os ratos foram anestesiados com sevoflurano a 3,5% (Sevorane®, Laboratório Abbott), por via inalatória, em campânula de plástico transparente. A seguir, quando houve imobilidade e perda do reflexo de endireitamento, os animais foram colocados em decúbito ventral e imobilizados em mesa cirúrgica. Para controle das concentrações administradas de anestésico, foi empregado vaporizador calibrado.

Grupo D (modelo de reperfusão com sevoflurano) - Os animais foram anestesiados com sevoflurano, da mesma forma que os do Grupo C. Os fígados retirados dos ratos do Grupo C foram transplantados e reperfundidos nesse grupo de ratos (Grupo D).

Assim, os animais dos Grupos A e C constituíram-se nos doadores de fígado, enquanto os dos Grupos B e D receberam o transplante hepático.

4.2.2.2. Procedimentos

O procedimento experimental foi dividido em seis etapas, conforme descrito a seguir (Anexo 1).

4.2.2.2.1. Primeira etapa – Retirada do fígado

Os seguintes procedimentos foram realizados nos animais dos Grupos A e C, com o uso de microscópio cirúrgico D.F. Vasconcelos (modelo MC.M903), utilizando aumento de 10 vezes.

a) Indução anestésica de animal do Grupo A ou C, respectivamente, com isoflurano a 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott) ou sevoflurano a 3,5% (Sevorane®, Laboratório Abbott) Foi assim que colocaste no item anterior.), por via inalatória, em campânula de plástico transparente. Quando o animal tornava-se imóvel e com perda de reflexo de endireitamento, era colocado em decúbito ventral e imobilizado na mesa cirúrgica. A manutenção da anestesia, durante todo

o procedimento, foi realizada pela administração do respectivo anestésico com vaporizador calibrado.

- b) Assepsia do abdômen com solução de povidine e posterior tricotomia.
- c) Laparotomia por via incisão longitudinal, com lâmina de bisturi nº 15.
- d) Dissecção da veia porta, com ligadura de suas tributárias, e canulação com cateter de aspiração traqueal nº 4 (Embramed®).
- e) Dissecção da artéria hepática e reparo da mesma com fio seda 3.0.
- f) Administração, por meio da veia cava inferior, de 250 UI de heparina (Liquemine®, Roche).
- g) Canulação da aorta infra-renal com cateter de aspiração traqueal nº 6 (Embramed®) e ligadura distal.
- h) Clampeamento da aorta supra-celíaca.
- i) Infusão, por meio da veia porta e da aorta, de 125 mL da solução de preservação UW (Viaspan®, Bristol-Myers-Squibb, com osmolaridade de 320 mOsm/L), a 4°C, com pressão de 60 cmH₂O.
- j) Sangria do animal, por meio da secção da veia cava superior.
- l) Resfriamento da cavidade peritoneal com solução gelada de NaCl 0,9%.
- m) Hepatectomia total, com ligadura da artéria hepática e da veia cava inferior.
- n) Canulação com cateter de aspiração traqueal nº 6 e sutura da veia cava superior, junto à emergência das veias supra-hepáticas, em mesa gelada.

4.2.2.2.2 Segunda etapa – Preservação do fígado

Esta representa a fase de isquemia a frio do fígado.

Para a preservação do fígado retirado dos animais dos Grupos A e C, o órgão foi acondicionado em recipiente plástico, com 80 mL de solução de UW (Viaspan®, Bristol-Myers-Squibb), a 4°C, por 6 horas.

Foram retiradas alíquotas dessa solução após 2, 4 e 6 horas de preservação, para a determinação de AST, ALT e LDH.

4.2.2.2.3 Terceira etapa – Preparo cirúrgico para o transplante hepático

Foi feito o preparo de um segundo rato, para ser utilizado na reperfusão do fígado preservado. Este animal foi alocado no Grupo B ou D, conforme o anestésico inalatório ao qual foi exposto.

Os procedimentos a seguir foram feitos com auxílio de microscópio cirúrgico, D.F. Vasconcelos (modelo MC.M903), utilizando aumento de 10 vezes.

a) Anestesia do Rato B ou D, respectivamente, com isoflurano ou sevoflurano, utilizando a mesma técnica descrita no item 4.2.1.a.

b) Assepsia do abdômen com solução de povidine e posterior tricotomia.

c) Laparotomia por via incisão longitudinal, com lâmina de bisturi nº 15.

d) Dissecção da veia cava inferior e seu clampamento abaixo da emergência das veias renais.

e) Dissecção da aorta e seu clampamento acima da bifurcação das artérias ilíacas.

f) Infusão de 250 UI de heparina (Liquemine®, Roche) em veia cava inferior.

4.2.2.2.4. Quarta etapa – Transplante e reperfusão hepática

Nesta fase, foi feita a reperfusão do fígado preservado, empregando os procedimentos descritos a seguir. Corresponde à etapa de isquemia a quente.

a) Retirada do fígado da solução de preservação e infusão de 5 mL de solução fisiológica, em temperatura ambiente, por meio do cateter em veia porta.

b) Canulação da veia cava inferior do Rato B ou D, com uma das extremidades do cateter que estava introduzido na veia cava superior do fígado preservado (retirado, respectivamente, de animal do Grupo A ou C), para obtenção de retorno venoso (via eferente da reperfusão); manutenção do fígado a ser reperfundido a 10 cm de altura em relação ao corpo do animal receptor.

c) Canulação da aorta do Rato B ou D, com uma das extremidades do cateter que estava introduzido na veia porta do fígado preservado em solução de UW (via aferente da reperfusão).

d) Liberação da perfusão de sangue arterial através do cateter inserido na aorta, iniciando-se a reperfusão do órgão.

e) Manutenção da reperfusão hepática extracorpórea, por período de 15 minutos (Figura 1).



Figura 1. Modelo de reperfusão hepática

O fígado dos ratos dos Grupos B ou D não foram retirados ou excluídos da circulação sistêmica.

4.2.2.2.5. Quinta etapa - Avaliação de isquemia/reperfusão (I/R) e estresse oxidativo (EO)

Foi coletada amostra sanguínea do efluente venoso ao final de 15 minutos de reperfusão, para determinação de AST, ALT, LDH e TBARS. Após a coleta das amostras, foram seccionados fragmentos do fígado reperfundido, para dosagem de TBARS, catalase e metabólitos do NO.

As dosagens de AST, ALT e LDH foram realizadas por meio de ensaio cinético, utilizando *kit* Liquiform®. Os valores foram expressos como UI/L.

Para a medida de TBARS do efluente venoso, soro foi aquecido com ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% e ácido tricloacético (TCA) a 10%, por 15 minutos em banho-maria, sendo a amostra posteriormente refrigerada e centrifugada. O produto corado foi quantificado por espectrofotometria, em 535 nm, por meio da técnica descrita por Bunge e Aust, em 1978. Os resultados foram expressos como nmol/mL.

A quantificação de TBARS no fragmento hepático foi realizada com a mesma técnica descrita para a dosagem no soro.

A atividade da catalase foi determinada por meio de reação entre tampão fosfato 50 mM, em pH neutro, e peróxido de hidrogênio 0,3 M, em homogeneizado do tecido hepático. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de 240 nm, conforme método de Boveris & Chance (1973). A dosagens das proteínas foram feitas pelo método de Biureto.(Lowry *et al*,1951). Os dados foram expressos como UI/mg de proteína.

Os produtos do NO foram determinados por meio do método de Griess (Hevel & Marletta, 1994). Foram acrescentados 20 µL de TCA a 25% a 500 µL de homogeneizado hepático, com posterior centrifugação e neutralização com bicarbonato de potássio a 2 M. A seguir, 10,5 µL de nitrato redutase (6 unidades/mL) e 10,5 µL de NADPH 1,1 mM foram adicionados a 210 µL do homogeneizado. Após 30 min de incubação em sala escura, sob temperatura ambiente, foram incluídos 10,5 µL de L-glutâmico desidrogenase, ácido 2-cetoglutárico 1M e cloreto de amônio 2,5 M. O material foi incubado por mais 10 min. Adicionou-se, então, o reagente de Griess (262,5 µL), com posterior incubação de 15 min. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 550 nm. A dosagens das proteínas foram feitas pelo método de Biureto. Os valores foram expressos como umol/mg de proteína.

4.2.2.2.6. Sexta etapa – Análise histopatológica

Nesta fase foi realizada a análise histopatológica do fígado reperfundido, empregando a coloração de hematoxilina-eosina (HE) (Figuras 2 e 3). Foram retiradas duas amostras do fígado reperfundido (lobos direito e esquerdo), que, a seguir, foram fixadas em formalina a 10%, incluídas em parafina e seccionadas a 3 µm. Posteriormente, os fragmentos foram montados sobre uma lâmina, fixados com xilol e corados. Todas as amostras anatomopatológicas codificadas foram analisadas pelo mesmo patologista, que desconhecia o grupo ao qual pertencia cada material. A avaliação das lâminas se deu em microscópio óptico, com aumentos de 40, 100 e 200X.

A lesão de preservação foi definida de acordo com critérios descritos por Gaffey *et al* (1997) (Anexo 3).

4.3. Tamanho da amostra

No Estudo 1, foram utilizados, inicialmente, 10 ratos em cada grupo experimental, perfazendo um total de 30 animais. No Estudo 2, foram utilizados 5 ratos em cada grupo, perfazendo 20 animais.

Foram utilizados como parâmetros para o cálculo do tamanho da amostra nível de significância (alfa) de 0,05, poder estatístico de 80%. Calculou-se, então, uma amostra de 10 animais, que deveriam ser submetidos a transplante e reperfusão do fígado (5 em cada um dos 2 grupos do Estudo 2).

4.4. Análise estatística

Foi montado Banco de Dados no programa Excel, dispostos na planilha do SPSS 10.0 para Windows. Posteriormente, os dados foram transferidos para o Programa de Análise Estatística SPSS, versão 12.0 (*Statistical Package of Social Sciences*).

Os dados do Estudo 1 foram expressos como variáveis quantitativas, por meio de média e desvio padrão (DP). As comparações de dispersão dos diversos grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de uma via

(ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK), quando indicado (Bliss, 1967; Zar, 1999).

No Estudo 2, os valores de AST, ALT e LDH, TBARS em soro e fígado e catalase hepática foram expressos como variáveis quantitativas, por meio de média e desvio padrão. Já as medidas de NO, por esta ter se mostrado uma variável assimétrica, foram descritas como mediana e intervalo interquartis (Bliss, 1967; Zar, 1999).

Para a comparação dos dois grupos propostos no Estudo 2, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes, quando se tratavam de variáveis paramétricas, e o teste de *U* de Mann-Whitney, quando se tratava de variável não-paramétrica (Bliss, 1967; Zar, 1999).

Para a comparação de valores obtidos nos grupos propostos, ao longo de diferentes tempos de medida, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK), quando indicado (Bliss, 1967; Zar, 1999).

Os dados referentes à análise histológica foram apresentados de forma descritiva. Foram apresentadas as freqüências relativas e absolutas de ocorrência de eventuais alterações histológicas nos grupos estudados (Zar, 1999).

4.5. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil, Lei 6.638 (Diário Oficial da União – 08/05/1979), que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, assim como regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação.

Atendendo a decreto que estipula ser o exercício da medicina de animais de laboratório atividade profissional privativa do Médico Veterinário - Decreto Lei 64.704 de 17/06/1969 (Capítulo II, Art. 2º, itens “c” e “d”) - de modo que todo o Biotério deve ter Médico Veterinário especializado em animais de laboratório para supervisão do mesmo, o local em que o presente projeto foi realizado contou com a orientação da Médica Veterinária Dra. Roseli de Oliveira Möllerker, responsável técnica pela Unidade de Experimentação Animal (UEA).

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados em *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – ILAR/EUA e Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil), estando de acordo com *Ethical Guideline for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela *International Association for the Study of Pain* (IASP). Tais procedimentos são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área. Obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences* - CIOMS) (Goldim & Raymundo, 1997).

O projeto foi enviado para análise pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tendo sido aprovado sob o número 04/408.

4.6. Financiamento

Para a realização desse trabalho, foi gasto um total de R\$ 5.329,00, financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE/HCPA).

5. Resultados

5.1. Estudo 1 - Efeito da anestesia com isoflurano ou sevoflurano sobre parâmetros bioquímicos e histológicos em ratos submetidos a hepatectomia.

Nesse experimento, foram avaliados, inicialmente, 30 ratos Wistar, 10 em cada grupo, com idade entre 90 e 120 dias. Porém, houve três perdas. Duas ocorreram por óbito durante o procedimento anestésico-cirúrgico, uma no grupo isoflurano e outra no grupo sevoflurano. Um terceiro rato, alocado no grupo controle total, por apresentar suspeita de estar doente, foi sacrificado em câmara de gás. Assim, para fins de análise, foi utilizado um total de 27 animais (9 por grupo).

Na Tabela 1, são apresentados os resultados referentes às medidas enzimáticas. A determinação de AST, ALT e LDH foi feita após período de 1 hora de anestesia, para os ratos dos Grupos 1 e 2, ou após a decapitação, para os ratos do Grupo 3. Quando analisados os valores séricos de aminotransferases e LDH, não se observou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1. Valores expressos como média \pm DP das enzimas AST, ALT e LDH no soro de ratos controles ou anestesiados com isoflurano ou sevoflurano.

	Isoflurano (n=9)	Sevoflurano (n=9)	Controle total (n=9)
AST (UI/L) ^a	171,9 \pm 072,1	184,9 \pm 093,2	215,4 \pm 58,2
ALT (UI/L) ^a	073,3 \pm 017,9	056,5 \pm 015,0	060,7 \pm 09,8
LDH (UI/L) ^a	1.474,4 \pm 594,8	1.507,2 \pm 973,7	2.116,6 \pm 617,9

^a Diferença não significativa entre os grupos; ANOVA de uma via, $P=0,47$ para AST; $P=0,06$ para ALT; $P=0,14$ para LDH.

AST =aspartato aminotransferase, ALT=alanino aminotransferase, LDH=lactato desidrogenase.

Foi aferida a lipoperoxidação por meio da mensuração de TBARS em sangue e tecido hepático. A Tabela 2 apresenta os dados obtidos.

Observou-se redução dos valores de TBARS em ambos os grupos submetidos à anestesia inalatória, sugerindo menor lipoperoxidação após administração desses agentes por 1 hora.

Tabela 2. Valores de TBARS (expressos como média \pm DP, em nmol/mL) em soro e fígado de animais controles ou submetidos à anestesia com isoflurano e sevoflurano.

	Isoflurano ^a n=9	Sevoflurano ^a n=9	Controle total ^b n=9
TBARS sérico	2,47 \pm 0,98*	1,95 \pm 0,87*	03,76 \pm 0,58
TBARS hepático	9,31 \pm 2,28	8,82 \pm 2,20	11,07 \pm 2,61

^a Diferença significativa entre os grupos; ANOVA de uma via, $P < 0,05$.

^b Diferença não significativa entre os grupos; ANOVA de uma via, $P > 0,05$.

* Diferença significativa em relação ao grupo controle total; teste de SNK, $P=0,001$.

TBARS= espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

No exame anatomopatológico, não se observou necrose hepatocitária em qualquer fígado estudado, assim como não houve neutrofilia, hiperplasia de células de Kupffer ou fibrose em quaisquer dos grupos. No Grupo 1 (n=9), houve um caso de balonamento hepatocitário e dois casos de proliferação colangiolar. Esta última alteração também ocorreu em dois casos no Grupo 2.

No Grupo 1, em dois casos, observou-se menos de 33% de esteatose. Já no Grupo 2, ocorreram 2 casos de esteatose, uma entre 33 e 66% e outra com intensidade menor que 33%. Não ocorreu esteatose nos fígados dos ratos do grupo controle. A Tabela 3 mostra estes achados.

Tabela 3. Frequência absoluta de alterações histológicas encontradas no tecido hepático de animais controles ou submetidos à anestesia com isoflurano e sevoflurano.

	Isoflurano n=9	Sevoflurano n=9	Controle total n=9
Balonamento hepatocitário	1	0	0
Esteatose hepática	2	2	0
Proliferação colangiolar	2	2	0

5.2. Estudo 2 - Efeito da anestesia com isoflurano ou sevoflurano sobre parâmetros bioquímicos e histológicos em modelo de transplante e reperfusão hepática.

Para a realização desse estudo, foram utilizados 20 ratos, distribuídos da seguinte forma:

- 1 Grupo A (isoflurano): 5 ratos;
- 2 Grupo B (modelo de reperfusão com isoflurano): 5 ratos;
- 3 Grupo C (sevoflurano): 5 ratos;
- 4 Grupo D (modelo de reperfusão com sevoflurano): 5 ratos.

Não houve óbitos nesta fase do estudo.

5.2.1. Fase de preservação do fígado ou de isquemia a frio

A lesão hepática durante a fase em que o fígado permaneceu na solução de preservação (isquemia a frio) foi aferida por meio da determinação de AST, ALT e LDH. Alíquotas foram retiradas do líquido de preservação em 3 momentos distintos: após 2, 4 e 6 horas de manutenção nesse meio.

Nas figuras 1, 2 e 3 são mostrados os resultados obtidos.

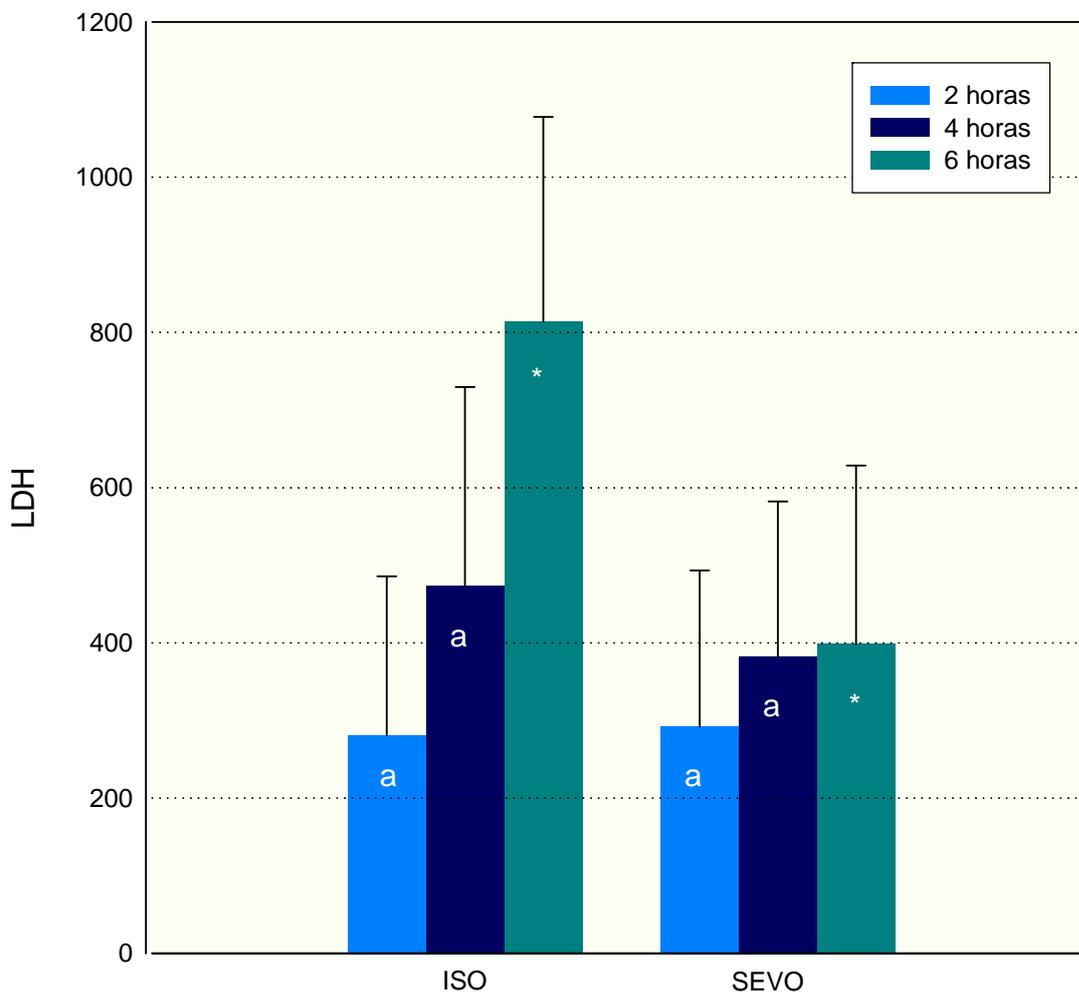


Figura 1. Valores de lactato desidrogenase (LDH), aferidos no líquido de preservação de fígados mantidos em solução de UW e retirados de animais previamente anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. Dados expressos como média e desvio padrão (UI/L).

^a Diferenças não significativas entre os grupos isoflurano e sevoflurano, nos tempos assinalados; teste *t* de Student, $P=0,93$ em 2 horas e $P=0,56$ em 4 horas.

^{*} Diferença significativa entre os grupos isoflurano e sevoflurano, após 6 horas de preservação; teste *t* de Student, $P<0,05$.

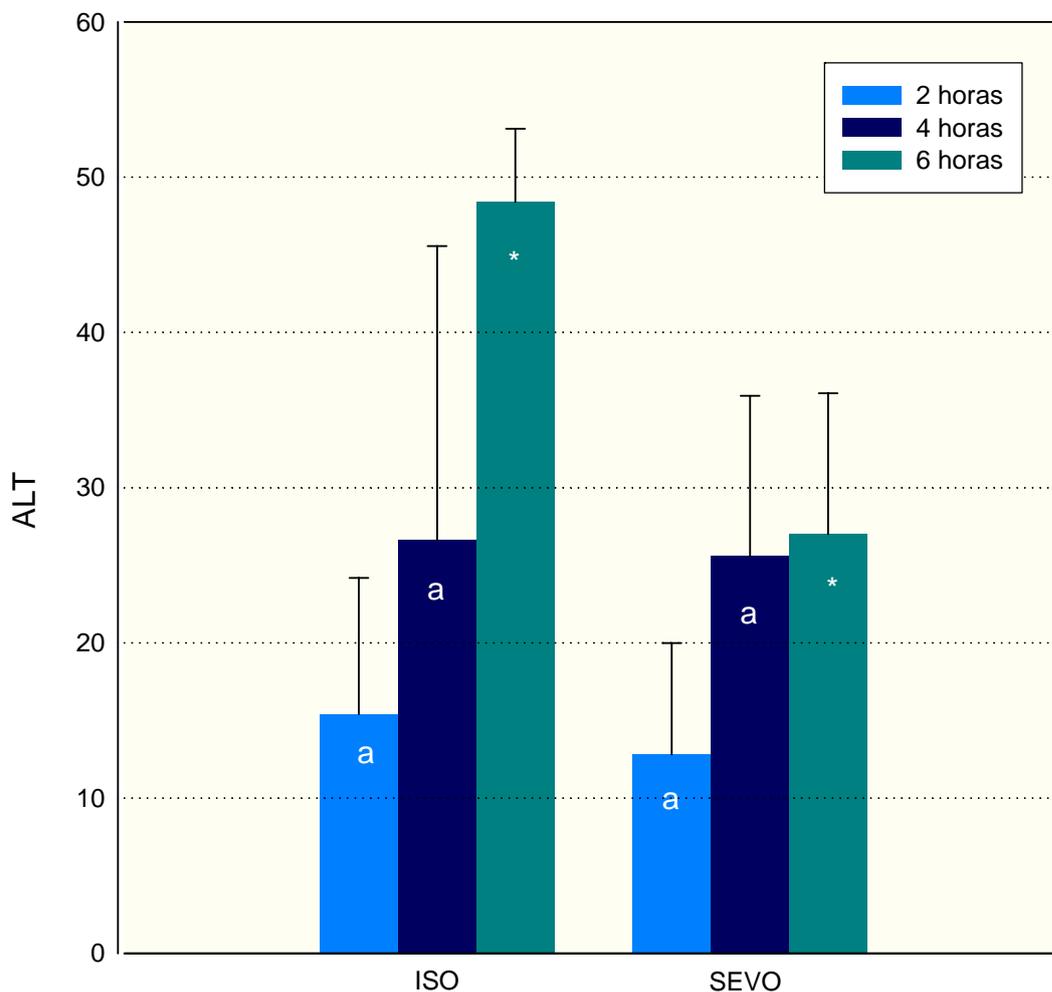


Figura 2. Valores de alanina aminotransferase (ALT), aferidos no líquido de preservação de fígados mantidos em solução de UW e retirados de animais previamente anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. Dados expressos como média e desvio padrão (UI/L).

^a Diferenças não significativas entre os grupos isoflurano e sevoflurano, nos tempos assinalados; teste *t* de Student, $P=0,62$ em 2 horas e $P=0,92$ em 4 horas.

^{*} Diferença significativa entre os grupos isoflurano e sevoflurano, após 6 horas de preservação; teste *t* de Student, $P<0,05$.

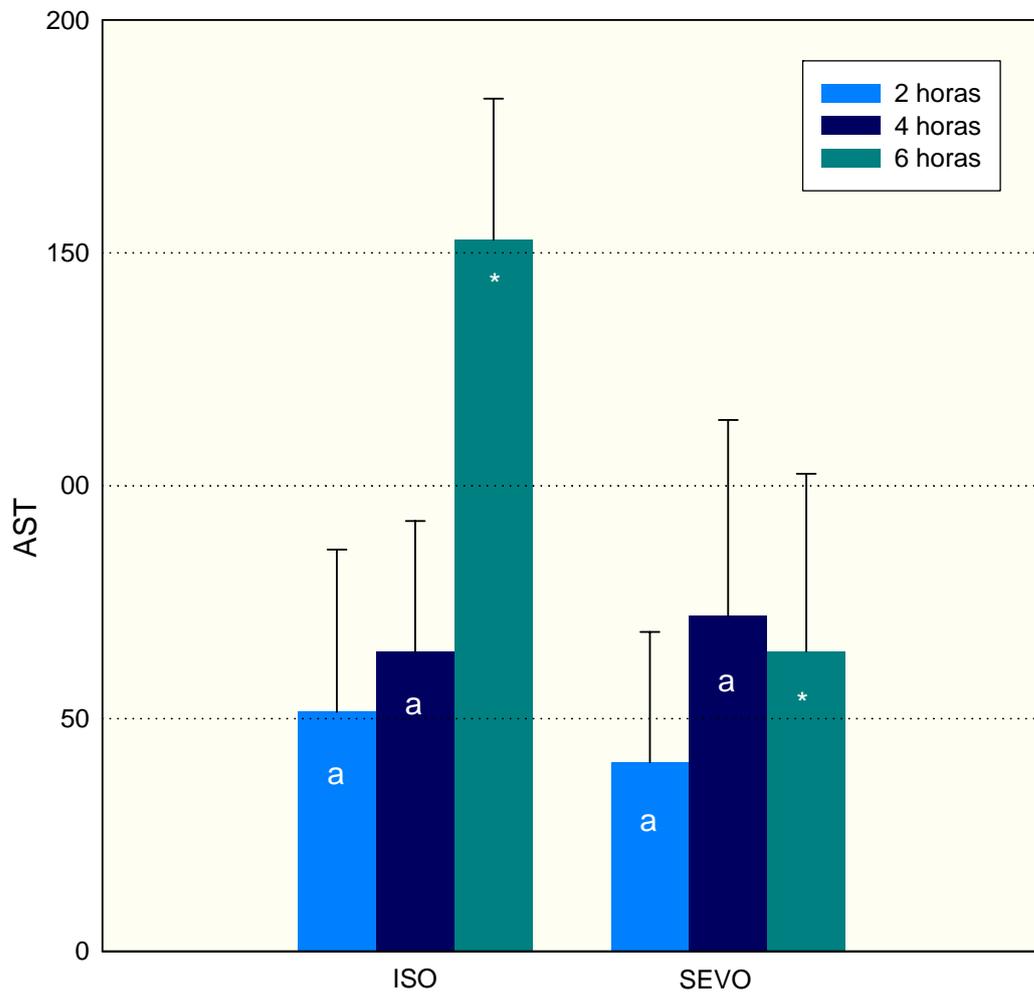


Figura 3. Valores de aspartato aminotransferase (AST), aferidos no líquido de preservação de fígados mantidos em solução de UW e retirados de animais previamente anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. Dados expressos como média e desvio padrão (UI/L).

^a Diferenças não significativas entre os grupos isoflurano e sevoflurano, nos tempos assinalados; teste *t* de Student, $P=0,60$ em 2 horas e $P=0,74$ em 4 horas.

* Diferença significativa entre os grupos isoflurano e sevoflurano, após 6 horas de preservação; teste *t* de Student, $P<0,05$.

Observou-se que, na solução de preservação dos fígados de animais anestesiados com isoflurano, os níveis da três enzimas avaliadas estão significativamente elevados após 6 h. Não se observaram alterações enzimáticas no grupo previamente anestesiado com sevoflurano, em comparação com o controle total, ou nos demais tempos estudados (Figuras 1 a 3).

5.2.2. Fase de reperfusão hepática ou de isquemia a quente

O tempo médio de isquemia a quente, ou seja, que se estendeu da retirada do fígado da solução preservadora até a reperfusão do órgão transplantado, foi de 57 e 58 min nos grupos B e D, respectivamente ($P= 0,7$).

Na Tabela 4, são apresentados os resultados referentes às medidas enzimáticas. Os níveis séricos de AST, ALT e LDH foram medidos nos dois grupos, ao final do período de 15 min de reperfusão hepática. Não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 4. Dosagem sérica de AST, ALT e LDH, após transplante e reperfusão do fígado. Dados expressos como média \pm DP (UI/L).

	Modelo de reperfusão com isoflurano (Grupo B) (n=5)	Modelo de reperfusão com sevoflurano (Grupo D) (n=5)	<i>P</i>
AST ^a	162,20 \pm 128,32	363,60 \pm 194,87	0,90
ALT ^a	150,60 \pm 102,21	338,80 \pm 203,70	0,10
LDH ^a	1.161,60 \pm 1.053,96	2.413,60 \pm 1.352,76	0,14

^a Ausência de diferença significativa; teste *t* de Student.

AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; LDH= lactato desidrogenase.

Na Tabela 5, são apresentados os resultados da avaliação da lipoperoxidação, realizada por meio do método de TBARS, em soro e tecido hepático, após a reperfusão.

Tabela 5. Dosagem de malondialdeído, por meio do método de TBARS, em soro e tecido hepático, após reperfusão hepática. Dados expressos como média \pm DP (nmol/mL).

	Modelo de reperfusão com isoflurano (Grupo B) (n=5)	Modelo de reperfusão com sevoflurano (Grupo D) (n=5)	<i>P</i>
TBARS soro*	7,93 \pm 1,32	1,88 \pm 0,64	0,001
TBARS fígado	9,95 \pm 2,99	13,27 \pm 2,38	0,089

*Diferença significativa entre os grupos; teste *t* de Student.

TBARS=substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Os resultados quanto à quantificação de substâncias antioxidantes, como a catalase, e a dosagem dos produtos do NO (nitritos e nitratos), após a reperfusão do tecido hepático, são apresentadas na Tabela 6.

Não houve diferença significativa entre os grupos no que se refere à medida de catalase. No entanto, observou-se redução do nível sérico de produtos de NO no grupo submetido a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano.

Tabela 6. Valores séricos de catalase (média \pm DP) e produtos do óxido nítrico (NO) (mediana e intervalos interquartis) de animais submetidos a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano ou sevoflurano.

	Modelo de reperfusão com isoflurano (Grupo B) (n=5)	Modelo de reperfusão com sevoflurano (Grupo D) (n=5)	
Catalase (U/mg/prot)	318,60 \pm 84,4,32	381,60 \pm 71,03	0,24
NO (nmol/mg/prot)*	0,06 (0,04-0,12)	1,03(0,90-1,20)	<0,05

^aDiferença não significativa entre os grupos; teste *t* de Student.

*Diferença significativa entre os grupos analisados; teste de *U* de Mann-Whitney.

NO= produtos do óxido nítrico

5.3. Análise anatomopatológica

Não foram observados casos de necrose hepatocitária, neutrofilia, hiperplasia de células de Kupffer, colestase ou proliferação colangiolar em quaisquer dos grupos experimentais.

No Grupo B, foram visualizados balonamento hepatocitário e esteatose em 44% dos animais. No Grupo D, balonamento hepatocitário esteve presente em 50% dos ratos e esteatose, em 25%. Dano de preservação foi detectado em 50% dos animais do grupo submetido a modelo de reperfusão com sevoflurano.

Nas figuras 4 e 5, são apresentadas imagens obtidas em tecido hepático de animais submetidos ao modelo de reperfusão de fígado sob anestesia com isoflurano e sevoflurano, respectivamente.

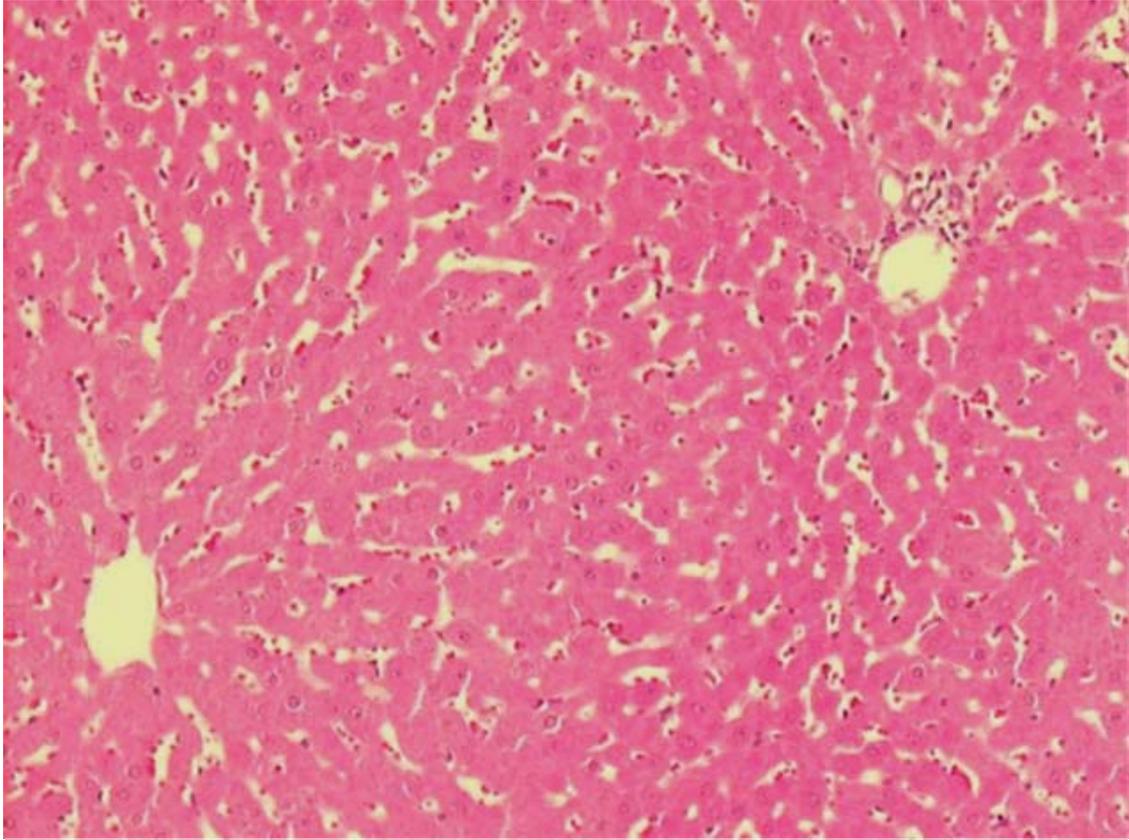


Figura 4. Tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (40 x de aumento) obtido de animal submetido a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com isoflurano.

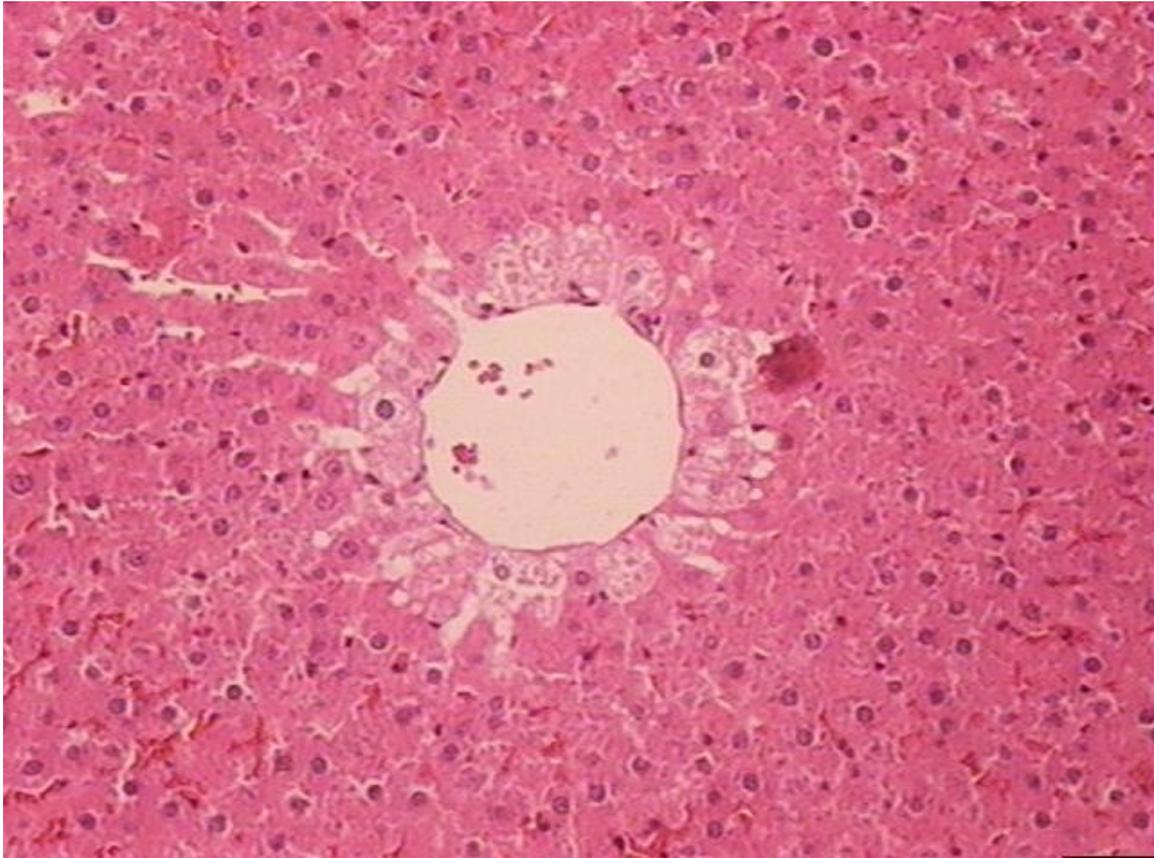


Figura 5. Tecido hepático corado com hematoxilina-eosina (100 x aumento) obtido de animal submetido a modelo de reperfusão hepática sob anestesia com sevoflurano.

6. Discussão

6.1. Em relação ao desenho do estudo

O transplante ortotópico de fígado em ratos é uma técnica muito utilizada no contexto de pesquisa. O uso de ratos apresenta algumas vantagens em relação ao emprego de outros animais, apresentando ampla viabilidade e baixo custo, apesar de ser requerido vasto treinamento técnico por parte da equipe de pesquisa (Lausada *et al*, 2002). Nesse trabalho, foram estudados dois anestésicos inalatórios (AI), isoflurano e sevoflurano, em um modelo que simula o transplante hepático, com o intuito de avaliar a capacidade de proteção de ambos contra o dano de isquemia e reperfusão(I/R).

Têm sido publicados estudos acerca da capacidade protetora de AI em diferentes situações de I/R. Wang *et al*, em 1997, utilizando coração isolado de ratos tratados com sevoflurano a 1,5 CAM e submetidos a isquemia e reperfusão, encontraram diminuição dos níveis de peroxidação lipídica em relação ao grupo controle. Posteriormente, outros autores também demonstraram efeito protetor dos AI em miocárdio, em situações de I/R (Kon *et al*, 1997; Mülleheim *et al*; 2003, Nader *et al*, 2004). Da mesma forma, Allaouchiche *et al*, em 2001, em modelo de isquemia normotérmica e reperfusão de fígado de porcos, demonstraram que o sevoflurano produz menos estresse oxidativo local e sistêmico, quando comparado com outro anestésico inalatório, o desflurano, sugerindo a possibilidade do mesmo ter alguma ação hepatoprotetora antioxidante. No entanto, a avaliação dessa ação potencial em isquemia a frio e reperfusão hepáticas, com base em levantamento na literatura, ainda não foi feita.

Com esse propósito, foram realizados dois estudos complementares nessa Dissertação. No Estudo 1, teve-se como objetivo foi o de caracterizar uma eventual lesão hepática, ou sua ausência dela, com o uso de dois anestésicos inalatórios – o isoflurano ou o sevoflurano. Para efeito de comparação, foi ainda estudado um grupo de ratos, considerados controles, apenas decapitados. Estes ratos serviram como um “controle branco”, uma vez que a avaliação bioquímica e

os parâmetros de lipoperoxidação neles encontrados devem, a princípio, refletir o que pode ocorrer na ausência da anestesia. Assim, com o Estudo 1, procurou-se avaliar o efeito isolado da anestesia inalatória sobre os parâmetros sistêmicos e hepáticos propostos, como um experimento “controle” para um segundo estudo. Para responder à questão principal dessa Dissertação foi delineado, então o Estudo 2, em que efetivamente os AI foram comparados em um modelo de isquemia a frio e reperfusão do fígado. Neste, o interesse maior ficou centrado no modelo de I/R.

No Estudo 1, os ratos foram anestesiados por 1 hora, e, a seguir, sacrificados. No Estudo 2, há uma peculiaridade que merece ser discutida. Neste estudo, foi feita a hepatectomia de um rato, para posterior transplante e reperfusão com o sangue de um segundo animal. Assim, o primeiro rato funcionou como doador e o segundo como receptor de fígado.

No Estudo 1, foi padronizado o tempo de anestesia de 1 hora. Poder-se-ia questionar se este tempo não foi demasiado curto para promover lesão hepática. No entanto, como o objetivo era avaliar os efeitos isolados da anestesia inalatória no modelo proposto e o tempo médio despendido na realização do procedimento anestésico-cirúrgico nessa situação era de 1 hora, optou-se por esse período de avaliação. É interessante notar, no entanto, que os agentes anestésicos, embora muitas vezes tóxicos, nem sempre promovem esta ação de uma forma evidente. Nesse contexto, quando se analisa a história da anestesia e sua relação íntima com o fígado, encontra-se um agente anestésico reconhecidamente hepatotóxico, o tetracloreto de carbono, que foi abandonado após 10 anos de uso não pela lesão hepática que causava, mas, sim, por sua cardiotoxicidade (Zimmermann, 1999). Seria, portanto, um objetivo irreal e talvez inalcançável provocar dano em 1 hora. Outrossim, sabe-se que a exposição repetida a AI, em especial o halotano, potencializa a toxicidade hepática (Zimmermann, 1999). Se o intuito fosse promover dano, poder-se-ia ter optado pela repetição dos procedimentos anestésicos. No entanto, o foco do Estudo 1 não reside na avaliação do dano, mas, sim, da capacidade de proteção do fígado por anestésicos inalatórios ou, pelo menos, de sua não interferência. Este terreno, o da proteção hepática, é

ainda mais pantanoso que o da hepatotoxicidade. Tanto que, ainda hoje, não se pode considerar seriamente que existam substâncias hepatoprotetoras para uso clínico.

Nos últimos anos, têm-se crescentes evidências da importância da geração de ERO para o desencadeamento da lesão hepática. A esteato-hepatite não-alcoólica é um exemplo disto. Nela, o papel das mitocôndrias na gênese de ERO é fundamental. Ademais, já foi demonstrada a depleção de agentes antioxidantes e vitaminas em estudos experimentais de esteatose e esteato-hepatite (Sanyal, 2004). Moreira *et al*, em nosso meio, publicaram em 2004 um estudo acerca dos efeitos protetores da quercitina, um agente antioxidante, em modelo animal de hipertensão portal induzida por ligadura parcial da veia porta. Neste observou-se aumento na concentração de TBARS. Igualmente, outros estudos têm demonstrado resultados semelhantes (Moreira *et al*, 2005). O Estudo 1 foi, assim, desenhado com o intuito de avaliar o efeito sobre a lipoperoxidação de dois AI habitualmente empregados durante a realização de transplantes hepáticos – isoflurano e sevoflurano, em comparação com grupo controle.

Na seqüência, foi desenhado e executado o Estudo 2. Em um primeiro momento, foi feita a preservação dos fígados explantados, provindos de ratos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano e preservados em solução UW. Os fígados foram preservados a frio. O tempo de isquemia a frio padronizado no estudo foi de 6 horas. Nesse caso, também, poderia também ser questionado se esse tempo não foi muito curto. De fato, em TxH, o tempo de isquemia a frio pode ser maior. Há sugestões de que, com o uso de UW, a isquemia a frio pode ser de até 24 horas. Moresco *et al*. (2004) estudaram a isquemia a frio em fígados de ratos durante esse período de tempo. Na prática clínica, no transplante realizado em seres humanos, aceitam-se órgãos com até 12 horas de isquemia a frio, isto porque, com períodos superiores, os resultados do transplante são piores (Kahn, 1996; Lemasters *et al*, 2001).

No desenvolvimento do presente estudo, cogitou-se adotar o padrão de 12 horas de isquemia a frio. Este período, no entanto, foi inviabilizado por questões técnicas. O tempo intermediário de 6 horas, então, foi o escolhido.

O modelo experimental de reperfusão hepática utilizado é original, desenvolvido pelo nosso grupo, como substitutivo ao transplante completo de fígado. Sendo assim, o método apresenta alguns aspectos peculiares que merecem destaque e que serão discutidos na seqüência.

O experimento contemplou as três fases do transplante - de isquemia a frio, isquemia a quente e reperfusão, ao contrário de outros estudos, que de forma muito diversa daquela que ocorre no TxH, avaliaram I/R apenas após a fase de isquemia normotérmica (Kawano *et al*, 1992; Karwinski *et al*, 1994; Helling *et al*, 1995; Reinders *et al*, 1996; Heijnen *et al*, 2001; Friend *et al*, 2001; Imber *et al*, 2002; Khandoga *et al*, 2003; Cursio *et al*, 2005). Embora a hipotermia seja essencial para a preservação de órgãos, por outro lado ela também ocasiona efeitos negativos sobre o enxerto (Selzner *et al*, 2003). Desta forma, parece ser essencial a avaliação do efeito das soluções de preservação em modelos que incluam período de isquemia a frio.

O fígado preservado do Grupo A ou C foi reperfundido com o sangue provindo da circulação sistêmica do rato do Grupo B ou D, que poderia ser considerado o “animal receptor”. Este é um aspecto do desenho experimental que qualifica o modelo utilizado, uma vez que simula um transplante real. Alguns estudos realizam a perfusão do órgão com um líquido de características similares às do sangue, e infundido por meio das denominadas “máquinas de perfusão” (Lutterová *et al*, 2001; Ishida *et al*, 2002; Cheng *et al*, 2005), o que não parece ser o mais adequado. Talvez, antes de se constituir em uma prova de sofisticação, isto pode ser fruto da incapacidade técnica de reperfusão.

Por outro lado, o sangue utilizado para a perfusão do órgão preservado foi de fonte arterial, proveniente da aorta do “animal receptor”, situação esta que contrasta com a do cenário do transplante, em que onde o enxerto é reperfundido com sangue portal. Durante a fase de desenvolvimento do presente modelo, a veia cava foi testada como via aferente de reperfusão. Porém, não houve sucesso. O sangue parecia não ter força suficiente para reperfundir o órgão. Provavelmente isto ocorreu devido à canulação do vaso com cateter longo e de fino calibre, levando à diminuição de pressão durante o trajeto até o fígado. Com isto, fez-se a

opção pela aorta como fonte de sangue. Esta artéria, por sua vez, apresenta fluxo sanguíneo alto e de elevada pressão, o que trouxe preocupações acerca do seu potencial de lesão do enxerto. Em analogia com o raciocínio prévio, a introdução de cateter longo e fino na artéria e a posterior elevação do órgão “doador” 10 cm em relação ao nível do “receptor” foram capazes de reduzir a pressão de perfusão e a probabilidade de dano ao órgão. Ainda durante o desenvolvimento do método, foi feita a análise histológica de fragmentos de fígados reperfundidos. Não houve indícios de dano endotelial ou hepatocelular, o que forneceu alguma segurança na utilização do modelo.

Outro ponto importante é que o tempo de perfusão do órgão foi de 15 minutos. Podem ser levantadas questões sobre a adequação desse curto período de perfusão. Quando o modelo foi planejado, ele o foi para uma reperfusão mais demorada, em torno de 60 minutos. No entanto, era essencial que o “animal receptor” fosse mantido em boas condições hemodinâmicas durante todo o procedimento. Isto foi possível apenas ao ser padronizado o tempo de 15 minutos. Paralelamente, não há estudos similares com os quais se possam realizar comparações. É interessante notar que, em modelos de reperfusão com máquinas e sem sangue, o tempo utilizado fica em torno de 120 minutos. Estudos prévios, no entanto, mostraram que a liberação de radicais livres ocorre imediatamente após a reoxigenação. Após 30 a 60 min de hipóxia, a enzima LDH está marcadamente aumentada nos primeiros 15 minutos de reoxigenação, após 30 a 60 min de hipóxia, e não há aumento significativo depois deste período (Ishida *et al*, 1997).

A aferição de eventuais lesões hepáticas foi feita por meio de avaliação bioquímica, de geração de ERO e do exame anatomopatológico. Os critérios bioquímicos foram as determinações sanguíneas de AST, ALT e LDH. Estas enzimas costumam se alterar em situações de dano do tecido hepático. Na prática clínica, são aferidas habitualmente no período pós-operatório de TxH. A AST é o mais sensível marcador de disfunção do enxerto (Everson & Kam, 2001). Fora do contexto de transplante, a ALT, por sua especificidade em relação ao fígado, é a principal enzima a ser aferida. A LDH é uma enzima da rota glicolítica e, embora

seja um indicador pouco específico de doença, é liberada quando há dano celular, como hipóxia e necrose. É um indicador pouco específico de doença (Souza *et al*, 2005). AST, ALT e LDH são utilizadas em conjunto no chamado índice de reperfusão, uma forma de ser estimado o dano ao tecido hepático no período pós-transplante imediato (Viebahn *et al*, 1998).

O EO vem sendo apontado como um dos principais fatores responsáveis pelo dano ao enxerto. Desta forma, a quantificação dos RL e substâncias antioxidantes torna-se um importante parâmetro para inferir a viabilidade do órgão pós-transplante (Biasi *et al*, 1995; Schauer *et al*, 2001; Burke *et al*, 2002; Grezzana *et al*, 2004). Sua aplicação, contudo, ainda é restrita à pesquisa, não sendo empregada na prática clínica. A maioria dos trabalhos simplificam a estimativa do EO na determinação de apenas uma variável, o MDA (Iasi *et al*, 2003; Moresco *et al*, 2004a e b). Neste estudo, entretanto, utilizamos 4 parâmetros TBARS no soro e fígado, produtos do NO, atividade da catalase com a intenção de se estimar o EO de forma mais fidedigna.

6.2. Em relação aos resultados do Estudo 1

Não houve diferença significativa em relação às variáveis bioquímicas quando comparados os três grupos, sugerindo que a administração de isoflurano ou sevoflurano por 1 hora não determina lesão hepática. De forma similar, não se observam alterações histopatológicas ou de lipoperoxidação (por TBARS) em tecido hepático, o que foi mensurado por meio da comparação dos grupos anestesiados e controle. No entanto, no soro, os níveis de TBARS nos animais anestesiados com isoflurano ou sevoflurano foram inferiores aos dos controles. Isto sugere que a anestesia por 1 h, reduzindo o nível de consciência do animal e algumas de suas funções orgânicas, pode levar à redução da resposta oxidativa, havendo menor produção de radicais livres. É importante lembrar que esses animais foram mortos e o material foi coletado enquanto estavam anestesiados. Já nos grupo controle, as medidas de estresse oxidativo foram coletadas após os animais serem submetidos ao estresse da manipulação.

TBARS expressa a capacidade de produção de radicais livres, mas não é suficientemente específico para que se possa aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos. Mesmo assim, esse é um resultado importante, por ser original e levantar novas hipóteses de trabalho.

6.3. Em relação aos resultados do Estudo 2

6.3.1. Em relação aos resultados obtidos no período de isquemia a frio

Durante o período de isquemia a frio, foram coletadas alíquotas do líquido de preservação UW, para avaliação de parâmetros enzimáticos. Optou-se pela dosagem de LDH, ALT e AST, devido ao fato dos níveis destas enzimas serem descritos na literatura como adequados parâmetros estimativos do dano do órgão durante a isquemia a frio e um importantes preditores do funcionamento do enxerto após o transplante (Jamieson *et al*, 1988; Lange *et al*, 1996).

No presente estudo, observou-se que, após 6 horas de preservação, havia diferença significativa nos níveis das 3 enzimas, mensurados na solução UW, ao se compararem os grupos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. Dosagens de LDH, ALT e AST mostraram-se mais elevadas no grupo anestesiado com isoflurano. Inicialmente, poder-se-ia pensar que a anestesia com isoflurano, mesmo por período curto de tempo (1 hora), seria capaz de determinar algum grau de dano ao fígado. No entanto, observou-se no Estudo 1 que isto não ocorre. Logo, os dados sugerem que a administração de isoflurano, embora não leve a alterações enquanto o animal está anestesiado e o fígado está sendo perfundido, é capaz de interferir com o padrão de resposta enzimática enquanto o fígado está na solução de preservação, em fase de isquemia a frio (4⁰ C). E deve-se atentar que este efeito necessita de algum tempo para ser expresso, já que aparece somente após 6 horas de preservação. Se há algum tipo de interação entre a solução UW e o isoflurano residual em tecido hepático, se a presença deste anestésico na vigência de redução de fluxo sanguíneo e/ou hipotermia é lesiva ao fígado, são tópicos a serem posteriormente pesquisados.

6.3.2. Em relação aos resultados obtidos no período após a reperfusão

A síndrome de I/R é definida como a redução em 30% da pressão arterial média, ocorrendo no período de 5 minutos após a reperfusão do enxerto. Costuma durar no mínimo 1 minuto, mas a hipotensão pode persistir por 1 hora ou mais. A gravidade da síndrome de I/R pode contribuir para a gênese da não-função primária do enxerto e o óbito (Ayoub & Ahmed, 2003). Sabe-se que a resposta inflamatória é um importante acontecimento na fisiopatologia da lesão de I/R. Na maioria dos órgãos, o período de isquemia, acompanhado pelo de reperfusão, associa-se com inflamação aguda e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Nader *et al*,2004).

Nesse estudo, a reperfusão foi realizada pelo período de 15 minutos, e a análise dos dados enzimáticos demonstrou ausência de diferença entre os AI empregados. Os níveis séricos da aminotransferases e LDH nos grupos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano foram semelhantes. Estes achados demonstraram que, embora houvesse elevação das enzimas no líquido de preservação do grupo do isoflurano, a diferença entre os animais anestesiados com os dois agentes propostos desapareceu após 15 min de reperfusão. Isto pode se dever à diluição desse, maior nível das enzimas no sangue total do animal, fazendo com que se deixasse de detectar a diferença entre os grupos. Ao mesmo tempo, o restabelecimento de um adequado funcionamento da atividade enzimática, pelo retorno do fluxo sanguíneo e/ou pela elevação da temperatura do órgão, poderia ser responsável pela normalização dos níveis observada.

Quando analisada a lipoperoxidação em tecido hepático, novamente não se observou diferença entre os dois grupos na fase de isquemia a quente. No entanto, ao se estudar a geração de EO em medidas séricas, foram observadas respostas diferentes, de acordo com o anestésico inalatório administrado.

A mensuração de lipoperoxidação (por TBARS) e geração de produtos de NO em soro mostrou diferenças entre os animais anestesiados com isoflurano ou sevoflurano. Aqueles anestesiados com o primeiro agente apresentaram maior lipoperoxidação e menores níveis de NO, em comparação com os do grupo que

recebeu sevoflurano. Quanto à ativação de mecanismos endógenos antioxidantes, aferidos pelo nível de catalase sérica, os dois grupos se mostraram semelhantes.

Assim, os dados sugerem que o emprego de isoflurano para anestesia durante a reperfusão, embora não tenha se refletido em dano hepático, leva a um aumento de lipoperoxidação, ou seja, a uma maior produção de radicais livres em fígado. Por outro lado, há uma redução nos níveis de NO nesse mesmo grupo. A razão pela qual o sevoflurano protegeu mais o metabolismo sistemicamente do que o isoflurano, isto é, reprimiu a formação de radicais superóxidos após a reoxigenação é ainda discutido. O possível mecanismo pelo qual o anestésico tenha reduzido a formação de radicais superóxidos pode ser pela ativação da NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-oxidase), mediante alterações na proteína C-cinase. (Kon, 1997)

A possível explanação da proteção dos anestésicos inalatórios e na preservação dos níveis de ATP durante a isquemia, seria reduzindo a adesão dos polimorfonucleares, aumentando a produção de óxido nítrico e inibindo a produção de radicais livres. Ishida *et al* utilizaram modelo de isquemia e reperfusão a quente, com sangue, em fígados de porcos. A isquemia foi feita através da ligação da artéria hepática e da veia porta, seguida de reperfusão por 240 minutos. Concluíram, através da análise de AST, ALT, LDH, lactato e glutatona, que não houve diferença entre os dois grupos de anestésicos escolhidos, isoflurano e sevoflurano, sugerindo que a escolha, em cirurgias que necessitam uma interrupção temporária de fluxo sanguíneo hepático, pode não fazer uma diferença significativa.

Por sua vez, Imai *et al*, em 1996, compararam isoflurano, sevoflurano e halotano em modelo de isquemia em fígados de ratos. Os autores realizaram a hepatectomia e mantiveram os fígados em um sistema de fluxo contínuo a 37°C, expostos aos anestésicos e oxigênio a 2L/min. Concluíram que houve diminuição no consumo de oxigênio com os três fármacos. O isoflurano, ao contrário do estudo em discussão, promoveu maior aumento nos níveis de LDH que os outros agentes anestésicos.

Há alguns pontos que merecem discussão adicional. A geração de produtos do NO foi superior no grupo anestesiado com sevoflurano. A primeira leitura feita foi a de que isto corrobora a impressão de que o isoflurano é melhor, mais protetor, pois teria gerado menos NO. O NO é o produto final da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), e apresenta uma série de efeitos fisiológicos em diferentes tecidos. O óxido nítrico é o maior responsável na modulação do tônus vascular em condições normais e patológicas. O local da inibição da vasodilatação dependente de óxido nítrico, mantém-se controverso. (Roger, 1995).

No fígado o NO está intimamente relacionado ao conceito de hipertensão portal. A hipertensão portal resulta de uma equação em que os denominadores são a resistência hepática e o fluxo através da veia porta. O NO tem a capacidade de reduzir a resistência hepática, ação que decorre do relaxamento induzido por ele nas células estreladas, que promove vasodilatação sinusoidal (Shah, 2004). Daí porque vem a pergunta: não seria a geração de produtos do NO um evento benéfico, posto que levaria à vasodilatação do órgão, e sua melhor perfusão? De fato, existe controvérsias quanto ao efeito do NO no transplante de fígado. Há evidências de que possa ser um mediador de rejeição, e um indicador da geração de maior EO tecidual. Por outro lado, o NO parece ter a capacidade de manter a perfusão hepática em condições fisiológicas em ratos, e pode ter um papel protetor na lesão de I/R (Ayoub & Ahmad, 2003).

6.4. Limitações do estudo

De acordo com o desenho deste estudo e os objetivos propostos, foram identificadas algumas limitações do modelo, que merecem ser discutidas.

- 1) Não foram realizadas medidas de catalase e de produtos do NO no Estudo 1. Por certo, seriam medidas importantes para comparação com os demais achados.
- 2) Não foi realizada a medida da pressão de perfusão hepática. Talvez isto tivesse sido importante em decorrência do fato de que a via aferente utilizada foi a aorta.

Há sensores que podem ser utilizados com esta finalidade. No entanto, eles apresentam sensibilidade apenas quando aplicados na parede do vaso, e não em cateteres, como foi o caso.

3) A monitorização da produção de bile poderia ter trazido um dado adicional sobre a função do fígado após a reperfusão. A produção de bile apresenta forte correlação com os níveis de ATP intracelular (Kamiike et al, 1985) e reflete o estado da microcirculação hepática (Misra et al, 2003). De fato, foi notada a produção de bile no estudo em questão, mas não foi controlado o seu débito.

5) Os animais utilizados são de linhagem não isogênica, o que possibilita o desencadeamento de rejeição por incompatibilidade doador-receptor. Os ratos Wistar utilizados são geneticamente semelhantes, o que minimiza o risco de rejeição. O modelo com reperfusão por período reduzido também colabora para diminuir a possibilidade de existir a formação precoce de uma resposta imunológica tão grave.

6) Talvez o tempo de perfusão de 15 minutos tenha sido, por outro lado, o principal limitante deste estudo. Neste curto período de reperfusão poderiam ser documentadas apenas alterações muito precoces do dano de I/R. A fase inicial (nas primeiras 2 h de reperfusão) é caracterizada principalmente pelo estresse oxidativo. Já na fase tardia (de 6 a 48 h após a reperfusão hepática), não contemplada neste estudo, ocorre uma reação inflamatória mediada pelos neutrófilos. Portanto, os dados são restritos, contemplando somente o período relacionado ao estresse oxidativo. É sugerido que o tempo curto de reperfusão seria suficiente para provocar lesão sinusoidal, mas não de hepatócitos. Isto, no entanto, talvez não seja verdadeiro.

7) Não foi feito o controle estruturado da própria síndrome de reperfusão, uma vez que não foram controlados eletrólitos em gasometrias após a reperfusão. Este costuma ser o momento de maior liberação de substâncias vasoativas causadoras de desequilíbrio hemodinâmico providas do fígado armazenado. Da mesma forma, a pressão arterial através da dissecação de vasos é importante para

acompanhar a reperfusão. Isto porque, uma vez que quando o fígado do Rato B é perfundido e o fígado do Rato A não é clampeado,

8) Os efeitos hemodinâmicos sistêmicos não foram considerados. O isoflurano diminui o débito cardíaco e altera a distribuição da circulação esplâncnica. Estas alterações podem ser minimizadas pela infusão endovenosa de fluidos, transfusão sangüínea ou, ainda, a administração de agentes inotrópicos. O controle hemodinâmico foi bastante rudimentar, baseado em dados clínicos, através da infusão de líquidos por via endovenosa.

9) Por fim, no Estudo 2 não houve um grupo controle. Talvez, a anestesia de um terceiro grupo de animais com outros anestésicos que não os inalatórios, como os endovenosos, pudessem ter trazido mais consistência aos achados.

7. Conclusões

De acordo com os métodos utilizados neste estudo e os resultados obtidos no mesmo, podem ser enunciadas as seguintes conclusões:

- 1) Não houve diferença significativa na lesão hepática aferida por parâmetros bioquímicos nos ratos anestesiados por uma hora com isoflurano e sevoflurano em relação ao grupo controle.
- 2) Observou-se redução na lipoperoxidação aferida por TBARS nos ratos anestesiados em relação ao grupo controle.
- 3) Não houve alterações anatomopatológicas significativas nos fígados dos ratos submetidos à anestesia ou nos ratos controles.
- 4) Houve redução significativa nos critérios bioquímicos de estimativa da lesão de isquemia a frio entre os ratos anestesiados com sevoflurano em relação àqueles anestesiados com isoflurano.
- 5) Não houve diferença entre os grupos isoflurano e sevoflurano após a reperfusão hepática em relação aos parâmetros bioquímicos.
- 6) A análise da lipoperoxidação após a reperfusão hepática demonstrou redução significativa da atividade de TBARS no soro de ratos anestesiados com sevoflurano.
- 7) A análise da lipoperoxidação hepática após a reperfusão do fígado não demonstrou diferença entre os dois anestésicos.
- 8) Houve aumento significativo na produção de espécies reativas de nitrogênio pós-reperfusão nos ratos anestesiados com sevoflurano.
- 9) Não houve diferença entre a atividade das enzimas antioxidantes endógenas aferidas pela catalase , após a reperfusão nos dois grupos.
- 10) Não houve diferenças na lesão hepática aferida pelo anatomopatológico nos dois grupos.

Referências bibliográficas

ABROSIO, G, TRITTO, I, CHIARELLO, M. The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J Mol Cell Card* 1995; 27:1035-1039.

ARORA, AS & GORES, GJ. The role of metals in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Semin Liver Dis* 1996; 16 (1): 31-38.

ASSOCIAÇÃO ESPANHOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO. Disponível em <http://www.aeeh.org/>. Último acesso em outubro de 2005.

ALLAUCHICHE B, DEBO R, GOUDABLE J, *et al.* – Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesth. Analg.*, 2001;93:981-985.

AS, AB, LOTZ, Z, TYLER, M, KAHN, D. Impact of early arterialization in the liver allograft. *Transpl Proc* 1999; 31: 406-407.

AYOUB T; AHMED K. Liver transplant anesthesia: an update. *Curr Opin Organ Transplant*. 2003; 8:252-7

BARON, PW, SINDRAM, D, HIGDON, D, HOWELLI, DN, GOTTFRIED, MR, TUTTLE-NEWHALL, JE, CLAVIEN, P-A. Prolonged rewarming time during allograft implantation predisposes to recurrent hepatitis C infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6:407-412.

BELLÓ-KLEIN A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI N.P. *Estresse Oxidativo e antioxidantes*. Editora da ULBRA, Canoas, 2002; 15-9.

BOSCH X. Spain rejects “social” reasons to deny access to transplantation. *Lancet*. 1999; 354: 1454

BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978, 52: 302-9.

BUSQUETS J, SERRANO T, FIGUERAS J, RAMOS E, TORRAS J, RAFECAS A, FABREGAT J, XIOL X, LAMA C, IBANEZ L, JAURRIETA E. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc*. 2002; 34: 252-3.

BURKE, A, FITZ, G, LUCEY, M R. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 217-221.

BUSUTTIL RW, FARMER DG, YERSIZ H, HIATT JR, McDIARMID SV, GOLDSTEIN LI, SAAB S, HAN S *et al.* Analysis of long-term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single-center experience. *Ann Surg*. 2005; 6: 905-16.

CADMIUM A, KVH, SASTRY R, *et al.* Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper. *Analytical Biochemistry* 2002;306:79-82.

CARRASCO L, SANCHEZ-BUENO F, SOLA J, RUIZ JM, RAMIREZ P, ROBLES R, RODRIGUEZ JM, PARRILLA P. Effects of cold ischemia time on the graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. *Transplantation*. 1996; 61: 393-6.

CLAVIEN PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology*. 1998; 28: 281-5.

COHEN AJ, BURCZYNSKI FJ, ROSSER BG, LIPSCHITZ J, MINUK GY. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials intracellular calcium concentrations and outcome following liver transplantation. *Am J Surg*. 2000; 179: 154-60.

CHAVEZ-CARTAYA, R, DESOLA, GP, RAMIRES-ROMERO, P, CALNE, SR, JAMIESON, NV. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J Surg Res* 1996; 60: 199-206.

CISNEROS, C, GUILLÉN, F, GOMEZ, R, GUTIERREZ, J, VORWALD, P, MONTERO, A, MORENO, E. Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft. *Transpl Proc* 1991; 23: 1976.

COBEA - Colégio Brasileiro De Experimentação Animal. Manual para Técnicos em Bioterismo. 2 ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

DE CARLIS L, SANSALONE CV, RONDINARA GF, COLELLA G, SLIM AO, ROSSETTI O, ASENI P, DELLA VOLPE A, *et al*. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int*. 1996; 9 Suppl 1: S414-7.

DUNNE, JB, PIRATVISUTH, T, WILLIAMS, R, TREDGER, JM. Treatment of experimental ischemia/reperfusion injury with S-adenosylmethionine. Evidence that donor pretreatment complements other regimens. *Transplantation* 1997; 63: 500-506.

EPA - Environmental Protection Agency. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment - EPA/630/R-96/009, Washington, 1996a.

EPA - Environmental Protection Agency. Health effects test guidelines reproduction and fertility effects. OPPTS 870: 3800, Washington, 1996b.

FERREIRA M.B. Anestésicos gerais. In: FUCHS, FD, WANNMECHER, L; FERREIRA, MBC. *Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional*. 3º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap 16. Pág 157-185.

GAFFEY MJ, BOYEL JC, TRAWEEK ST, ALI MA, REZEIG M, CALDWELL SH, IEZZONI JC, McCULLOUGH C, *et al*. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1997; 25: 184-9.

GOLDIM, JR, RAYMUNDO, MM. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2 ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas/Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação; 1997. 30p.

HEINDL, B, REICHLER, F M, ZAHLER, S, CONZEN, P F, BECKER, BF. Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing post ischemic adhesion polymorphonuclear neutrophils. *Anesthesiology* 1999;91:521-530.

HERTL, M, HOWARD, TK, LOWELL, JA, SHENOY, S, HARVEY, PR, STRASBERG, SM. Changes in liver core temperature during preservation and rewarming in human and porcine liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1996; 2: 111-117.

HIROKAWA F, NAKAI T, YAMAUE H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation*. 2002; 74: 779-83.

HIROSHI, I, YOSHITAMI, K, TERUKO, S, ATSUSHI, N, TOSHIYUKI, O, YUICHI, K. Comparison between sevoflurane and isoflurane anesthesia in pig hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Anesth* 2002; 16:44-50.

KENNA, *et al.* The organ toxicity of inhaled anesthetics. *Anesthesia Analgesia* 1995; 81(6S): 51s-66s.

IMAI, M, KON, S, INABA, H. Effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on ischemia-reperfusion in the perfused injury in the perfused liver of fasted rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996 40:1242-1248.

ISHIDA, T, YARAMIZU, K, GUTE, DG, KORTHUIS, RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997; 8: 86-94.

ISOZAKI, H, GIGOU, M, SZEKELY, AM, SHEN, M, BISMUTH, H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 1992; 79: 310-313.

JAESCHNKE, H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25: 774-780.

JAMIESON NV, LINDELL S, SUNDBERG R, SOUTHARD JH, BELZER FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation*. 1988; 46: 512-6.

JIMENEZ ROMERO C, MORENO GONZALEZ E, COLINA RUIZ F, PALMA CARAZO F, LOINAZ SEJUROLA C, RODRIGUEZ GONZALEZ F, GONZALEZ PINTO I, GARCIA GARCIA I, *et al.* Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation*. 1999; 68: 572-5.

JULAPALLI VR, KRAMER JR, EL-SERAG HB. Evaluation for liver transplantation: Adherence to AASLD referral guidelines in a large veterans affairs center. *Liver Transpl*. 2005; 11: 1370-8.

JUNG SE , YUN I-J , YOUN Y-K , LEE J-E , HA J , NOH D-Y , KIM S-J , OH SK , CHOE K-J . Effect of protease inhibitor on ischemia-reperfusion injury to rat liver . *World J Surg* 1999 23 : 1027-31.

KAHN D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomatic biliary structures *HPB Surg*. 1996; 9: 113-5.

KON, S, IMABI, M, INABA, H. Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats. *Anesthesiology* 1997; 86: 128-136.

LAND, W. Prologue. *Transpl Proc* 1998 a; 30: 4210-4213.

LANGE R, ERHARD J, RAUEN U, DE GROOT H, EIGLER FW. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation*, 1996; 62: 1255-9.

LAUSADA NR, GONDOLESI GE, ORTIZ E, DREIZZEN E, RAIMONDI JC. Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2002; 32: 63-70.

LEMASTERS JJ, BUNZENDAHK H, THURMAN RG. Preservation of the Liver. In: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell ME, eds, *Transplantation of the Liver*, 3rd ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001: pp 251-73.

LUCENA, F.J, REZENDE A A, RODRIGUES S J, ALMEIDA M G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos com sevoflurano, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 2004; 54:5:640-649.

McCORMICK A, SULTAN J. Liver transplantation--patient selection and timing. *Med J Malaysia*. 2005; 60 SupplB: 83-7.

McMASTER P, VADEYAR H. Criteria for liver graft allocation in the era of organ shortage. *Acta Chir Belg*. 2000; 100: 285-7.

MASSBERG, S & MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30: 4217-4223.

MELENDEZ HV, HEATON ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation*. 1999; 68: 469-71.

MIRZA D, GUNSON B, DA SILVA R, MAYER A, BUCKELS J, McMASTER P. Policies in Europe on "marginal quality" donor livers. *Lancet*. 1994; 344: 1480-3.

MINOR, T, ISSELHARD, W. Impaired vascular conductance after global hepatic ischemia. Significance of the oxygen paradox and the vascular endothelium. In: ??

MESSMER, K, MENGER, MD, LAND, E : Microcirculation in organ transplantation. *Progress in applied microcirculation*. Karger, Basel, 1995; pp 33-42

MORESCO RN, SANTOS RCV, ALVES FILHO JCF, OLIVEIRA JR. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage after 12 and 36 hours of rat liver preservation. *Transplant Proc*. 2004; 36: 2593-5.

MORIKA D, TAKADA Y, KASAHARA M, ITO T, URYUHARA K, OGAWA K, EGAWA H, TANAKA K. Living donor liver transplantation for noncirrhotic inheritable metabolic liver diseases: impact of the use of heterozygous donors. *Transplantation*. 2005; 80: 623-8.

NADER, N, LI, CM, KHADRA, WZ, REEDY R, PANOS AL. Anesthetic Myocardial Protection with sevoflurano: Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. 2004; 18(3): 269-274.

MULLENHEIM J. *et. al* in Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits. Anesthesiology 2003; 99(3):624-631.

National Research Council-Institute of Laboratory Animal Resources, Committee on Rodents. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press, 1996. 125p.

NICOLLI, A, CONSTANTINI, P, BASSO, E, COLONNA, R, PETRONILLI, V, BERNARDI, P. Potential role of cyclosporin A- sensitive mitochondrial channels in ischemia-reperfusion injury. Transpl Proc 1995; 27: 2825-2826.

NIELSEN VG , TAN, S , KIRK, KA , BAIRD, MS , MCCAMMON, AT , SAMUELSEN, PN , PARKS, DA . Halothane and xanthine oxidase increase hepatocellular enzyme release and circulating lactate after ischemia-reperfusion in rabbits . Anesthesiology 1997; 87 : 908-17 .

NISHIYAMA, T , YOKOYAMA, T , HANAOKA, K . Liver function after sevoflurane or isoflurane anaesthesia in neurosurgical patients . Can J Anaesth 1998; 45 (8) : 753-6 .

NISHIYAMA, T , HANAOKA, K . Inorganic fluoride kinetics and renal and hepatic function after repeated sevoflurane anesthesia . Anesth Analg 1998; 87 : 468-73 .

NISHIYAMA, T , YOKOYAMA, T , HANAOKA, K . Liver and renal function after repeated sevoflurane or isoflurane anaesthesia. Can J Anaesth 1998 45 (8) : 789-93.

NORMAN, DJ. Allocation of livers for liver transplantation. Ethics and politics. Clin Liver Dis 1997; 1: 281-6.

NOVALIJA, E, FUJITA, S, KAMPINE, J, STOWNE, D. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. Anesthesiology 1999;(3):701-716.

ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES. Disponível em <http://www.donacion.organos.ua.es/ont/>. Último acesso em outubro de 2005.

OTTE JB, GOYET JV, REDING R. Liver transplantation for hepatoblastoma: Indications and contraindications in the modern era. Pediatr Transplant. 2005; 9: 557-65.

PATEL, T & GORES, GJ. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia and viral disease. Liver Transplant Surg 1998; 4(1): 42-50.

PETROWSKY, H, DIPPE, B, GECK, P, LINCKE, M, KOENIG, J, BHATTI, S, WENISCH, HJC, ENCKE, A. Do oxygen radicals play a role in primary dysfunction of transplanted livers following preservation in University of Wisconsin solution? Transplant Proc, 1995; 27: 739-731.

POST, S, PALMA, P, GONZÁLEZ, AP, RENTSCH, M, MENGER, MD. Microcirculatory events after reperfusion in liver transplantation. In: MESSMER, K, MENGER, MD LAND, E: Microcirculation in organ transplantation. Progress in applied microcirculation. Karger, Basel, 1995; pp 43-50.

PRECKEL, B, SCHLACK, W, COMFERE, T, OBAL, D, BARTHEL, H, THÁMER, V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischemia in the rabbit heart in vivo. Br J Anaesth 1998; 81:905-912.

ROSEN HR, MADDEN JP, MARTIN P. A model to predict survival following liver retransplantation. Hepatology. 1999; 29: 365-70.

RHODEN, EL. Isquemia e reperfusão normotérmica hepática e efeitos do alopurinol: estudo experimental em ratos. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998 [dissertação de Mestrado].

ROSS, S, FOEX, P. Protective effects of anaesthetics in reversible and irreversible ischaemia-reperfusion injury. Br J Anaesth 1999; 82: 622-32.

ROGER, AJ, TICHOTSKY A. Halothane and isoflurane inhibit endothelium-derived relaxing factor-dependent cyclic guanosine monophosphate accumulation in endothelial cell-vascular smooth muscle co-cultures independent of an effect on guanylyl cyclase activation. Anesthesiology 1995; 83(4):823-833.

SCHLACK, W ,PRECKEL, B, STUNNECK, D, THÁMER, V. Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane, and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. Br J Anaesth 1998; 81:913-919.

SHACKLETON CR. Upregulation of major histocompatibility complex-expression under ischemic conditions in experimental models. Transplant Proc. 1998; 30: 4264-6.

SHAH V. Portal Hypertension: Just Say NO. American Association for the Study of Liver Diseases PostGraduate Course. Boston, 2004, pp 144-50.

SOUTHARD, JH & BELZER, FO. Principles of organ preservation. In: BUSSUTIL, RW & KLINTMALM, GB. Transplantation of the liver. Philadelphia WB Saunders Company, 1996; pp 379-385.

STRASBERG, SM. Donor selection and preservation injury: "it all starts here". Liver Transplant Surg 1997, 3(5) Suppl: 1, S1-S7.

TAKEMOTO, Y, UCHIDA, M, NAGASUE, N, OHIWA, K, KIMOTO, T, DHAR, DK, NAKAMURA, T. Changes in calcium content of the liver during hepatic ischemia-reperfusion in dogs. J Hepatol 1994; 21: 743-747.

TEOH NC, FARREL GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 891-902.

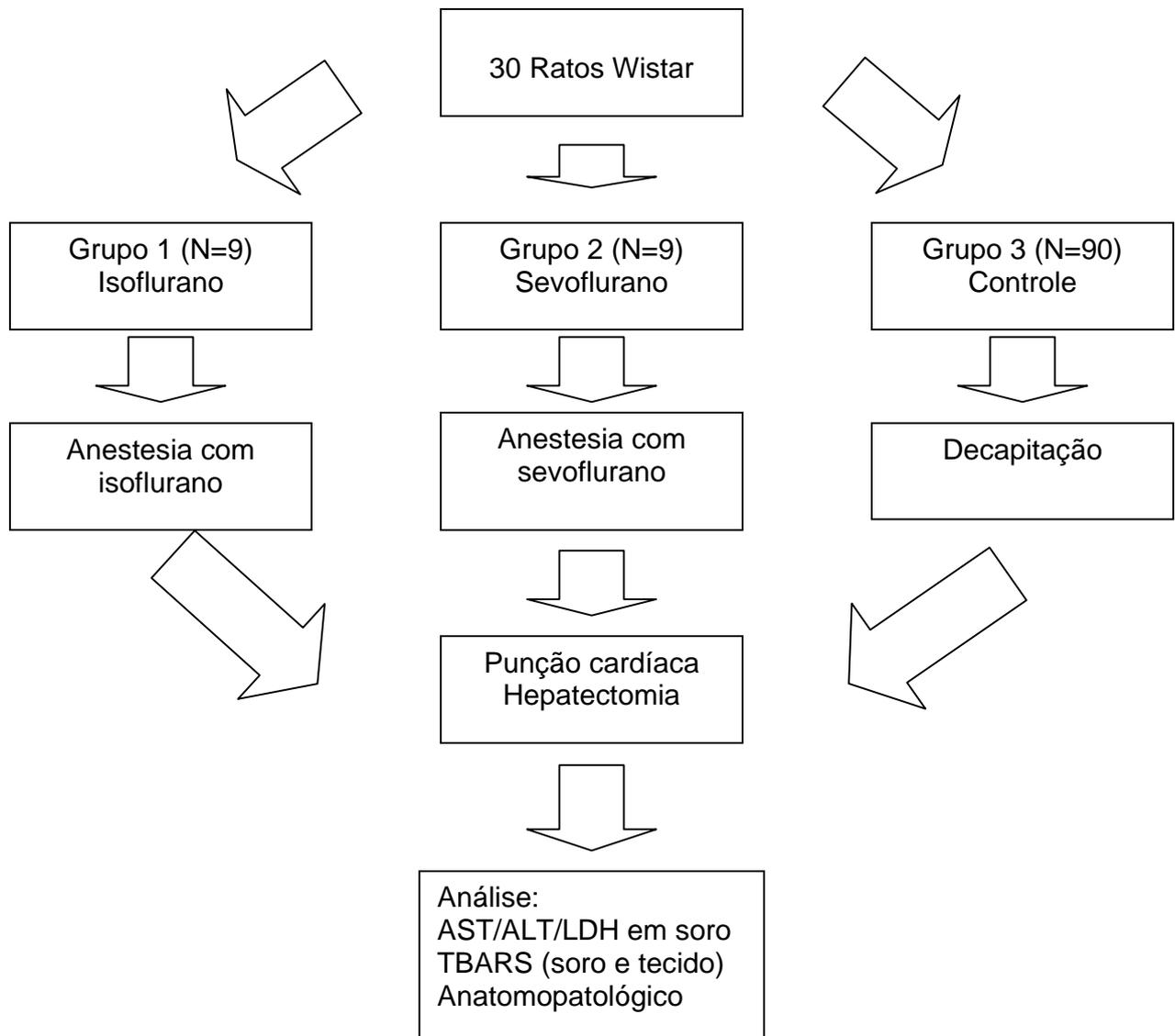
WANG L, FLORMAN S, ROAYAIE S, BASILE J, ZHANG ZY, MACHAC J, BOROS P, MILLER CM. Differential in vivo recovery of sinusoidal endothelial cells,

hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. *Transplantation*. 1998; 66: 573-8.

WIESNER RH. Current indication, contraindications and timing for liver transplantation. In: Busuttil RW; Klintmalm GB eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996.

WILLET, K, VAZ de MACÊDO, D, DETRY, O, EVANS, A, PEREIRA DA SILVA, L, SLUSE, FE. Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and “in vivo” . *Transpl Proc* 1995; 27: 2827-2828.

ANEXO 1. Fluxograma Estudo 1



ANEXO 2. Fluxograma Estudo 2

