

**EFEITOS DO PRÉ-CONDICIONAMENTO POR OXIGENOTERAPIA
HIPERBÁRICA NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO
HEPÁTICA EM RATOS**

Cristiano Xavier Lima

**Belo Horizonte
2006**

Cristiano Xavier Lima

**EFEITOS DO PRÉ-CONDICIONAMENTO POR OXIGENOTERAPIA
HIPERBÁRICA NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICA EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Cirurgia Abdominal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Co-orientador: Prof. Dr. João Baptista de Rezende Neto

Belo Horizonte
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Penna

Vice-Reitora: Profa. Dra. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Francisco José Penna

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Chefe: Prof. Dr. Walter Antônio Pereira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Coordenador: Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

Sub-coordenador: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Andy Petroianu

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Marco Antônio Gonçalves Rodrigues

Albert Christian Corrêa Mendonça (Representante Discente)

**EFEITOS DO PRÉ-CONDICIONAMENTO POR OXIGENOTERAPIA
HIPERBÁRICA NA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICA EM
RATOS**

Dissertação apresentada e defendida perante a Comissão Examinadora, constituída pelos

Professores Doutores:

Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo

Prof. Dr. Ricardo Costa Val do Rosário

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (orientador)

Prof. Dr. João Baptista de Rezende Neto (co-orientador)

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, MG

2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Célio e Maria Consuelo, pelo amor e exemplo de vida.

À minha esposa Andréa, pela dedicação, incentivo e compreensão nos momentos de ausência pelo exercício da prática médica e estudo.

Aos meus filhos Arthur e Henrique, que me fazem renascer a cada novo dia.

Aos meus irmãos André, Bernardo, Daniel e Érico, pela felicidade de compartilharmos nossas vidas em família.

A Deus, pela vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wilson Luiz Abrantes, meu grande mestre, pelo exemplo, confiança e incentivo para terminar este trabalho.

Ao Professor Dr. Marcelo Dias Sanches, meu orientador e amigo, pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. João Baptista de Rezende Neto, meu orientador, pela amizade e valiosos ensinamentos em cirurgia experimental.

Ao saudoso Professor Dr. Marcos dos Mares Guia e ao Professore Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, os quais, com seu exemplo e vocação, durante meus primeiros anos de graduação, me ensinaram o verdadeiro valor e o respeito à pesquisa científica.

Ao Dr. Roberto Carlos de Oliveira e Silva, por disponibilizar seu laboratório de Medicina Hiperbárica, pela amizade e exemplo de persistência e dedicação.

Ao Professor Dr. José Renan da Cunha Melo, pelos valiosos conselhos na elaboração do estudo, e por disponibilizar seu laboratório para realização do experimento.

Ao Professor Dr. Mauro Martins Teixeira e Professora Dra. Danielle da Glória de Souza pelo valioso auxílio.

Ao aluno da graduação Guilherme de Castro Santos, pela inestimável ajuda.

Aos Drs. Domingos André Fernandes Drumond, Guilherme Durães Rabelo, Marcus Antônio de Carvalho e Silvério Macedo Garcia, minha equipe do Hospital Felício Rocho, pela compreensão nos momentos de ausência e pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Minas Gerais, instituição que me acolheu na graduação e na pós-graduação.

“O conhecimento amplia a vida. Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede
desfrutar”.

Do livro: Exegese Logosófica.

Lista de Abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina-aminotransferase
AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
DHL	Desidrogenase láctica
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IR	Isquemia e reperfusão
LIR	Lesão de isquemia e reperfusão
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
OH	Oxigenoterapia hiperbárica
PAM	Pressão arterial média
TNF	Fator de necrose tumoral

Lista de Figuras

Figura 1 –Peso dos animais (n=8 animais/grupo)	34
Figura 2 – Nível sérico de aspartato-aminotransferase (AST) dos animais durante o procedimento operatório (n = 8 animais/grupo).....	36
Figura 3 – Nível sérico de alanina-aminotransferase (ALT) durante o procedimento operatório (n = 8 animais/grupo).....	37
Figura 4 – Nível sérico de DHL durante o procedimento operatório (n = 8 animais/grupo).....	39
Figura 5 – Número relativo de neutrófilos/mg de tecido hepático após 30 minutos de isquemia hepática segmentar e 30 minutos de reperfusão hepática (n = 8 animais/grupo).....	42
Figura 6 – Número relativo de neutrófilos/mg de tecido pulmonar após 30 minutos de isquemia hepática segmentar e 30 minutos de reperfusão hepática (n = 8 animais/grupo).....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Pressão arterial média (PAM) dos animais durante o procedimento operatório (n = 8 animais /grupo)	41
--	----

Resumo

A lesão de isquemia e reperfusão (LIR) hepática constitui resposta celular, bioquímica e imunológica a reperfusão do fígado submetido à oclusão temporária de fluxo sanguíneo. São descritos vários métodos cirúrgicos e farmacológicos para atenuar sua intensidade, e diminuir suas conseqüências deletérias. A oxigenoterapia hiperbárica (OH) é método eficaz no tratamento de diversas doenças relacionadas à má oxigenação tecidual.

Com o objetivo de estudar os efeitos do pré-condicionamento por OH na LIR, em ratos submetidos a isquemia hepática segmentar normotérmica foram utilizados 32 ratos Wistar machos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais de acordo com o procedimento realizado: grupo A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático; grupo B – oclusão do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado por trinta minutos e reperfusão por trinta minutos; grupo C – OH a 2,5 atm por 90 minutos seguida de oclusão do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado por trinta minutos e reperfusão por trinta minutos; grupo D – exposição ao ar ambiente a 2,5 atm por 90 minutos seguida de oclusão do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado por trinta minutos e reperfusão por trinta minutos. O nível sérico de aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase e desidrogenase láctica foram dosadas antes da isquemia, aos 30 minutos de isquemia e após 30 minutos de reperfusão. A pressão arterial durante o procedimento foi aferida por canulação da artéria carótida esquerda. Foi dosada a concentração tecidual de mieloperoxidase do fígado e do pulmão ao término da reperfusão.

O pré-condicionamento por OH acentuou o aumento da concentração sérica de alanina-aminotransferase, causou maior infiltração tecidual de leucócitos no fígado e pulmão e não atenuou a queda de pressão intra-arterial ocorrida na reperfusão do fígado, comparativamente aos grupos não tratados.

Em conclusão, o pré-condicionamento por OH agravou a lesão hepatocelular e aumentou a infiltração leucocitária no parênquima hepático e pulmonar em ratos submetidos a isquemia e reperfusão do fígado.

Índice

1	Introdução.....	14
2	Revisão da literatura.....	16
3	Objetivo.....	26
4	Método.....	27
4.1	Animais.....	27
4.2	Divisão dos grupos.....	27
4.3	Tratamento hiperbárico.....	28
4.4	Procedimento cirúrgico.....	28
4.4.1	Técnica anestésica.....	28
4.4.2	Técnica operatória.....	29
4.5	Colheita de sangue.....	30
4.6	Monitorização pressórica.....	30
4.7	Análise bioquímica do sangue.....	31
4.8	Análise da concentração tecidual da mieloperoxidase.....	31
4.9	Análise estatística.....	32
5	Resultados.....	34
5.1	Peso dos animais.....	34
5.2	Análise bioquímica do sangue.....	35
5.2.1	Aspartato-aminotransferase.....	35
5.2.2	Alanina-aminotransferase.....	36
5.2.3	Desidrogenase láctica.....	38
5.3	Pressão arterial média.....	40
5.4	Mieloperoxidase hepática.....	41
5.5	Mieloperoxidase pulmonar.....	41
5.6	Mortalidade.....	43
6	Discussão.....	44
7	Conclusão.....	49
8	Summary.....	50
9	Referências bibliográficas.....	51
10	Anexos.....	73

1 Introdução

As ressecções e o transplante do fígado têm se destacado como método terapêutico para o tratamento de diversas afecções hepáticas. O aprimoramento das técnicas operatória e anestésica, associado ao conhecimento da fisiopatologia dos eventos per e pós-operatórios (Bismuth and Sherlock, 1990) reduziram as taxas de morbi-mortalidade associadas a estes procedimentos.

As técnicas para prevenção e controle do sangramento trans-operatório expõem o fígado a períodos de isquemia. Alterações observadas no período de reperfusão, relacionadas, principalmente à duração da isquemia, se expressam por distúrbios da microcirculação hepática, hipotensão arterial, elevação da concentração sérica de aminotransferases e de desidrogenase láctica, disfunção mitocondrial e lipoperoxidação. Tais alterações se originam em complexa interação entre depleção de trifosfato de adenosina (ATP), adesão e ativação de leucócitos, células de Kupffer e plaquetas nos sinusóides hepáticos, liberação de proteases e fosfolipases, ativação do complemento e formação de espécies reativas de oxigênio (Miranda et al., 2004). Ao conjunto destas alterações se denomina lesão de isquemia e reperfusão (LIR) hepática.

Embora existam procedimentos para se evitar ou atenuar a LIR do fígado, não há método totalmente eficaz ou aplicável a todas situações clínicas. Dentre estes, o pré-condicionamento hepático, seja farmacológico ou isquêmico, atua no período que antecede a isquemia, fase de ativação de inúmeras alterações moleculares responsáveis pela LIR.

As indicações da oxigenoterapia hiperbárica (OH) estão estabelecidas para o tratamento de doenças associadas à isquemia tecidual. Entre seus principais mecanismos de ação está o de oferecer concentração tecidual de oxigênio até vinte vezes maior que a encontrada em condições normoatmosféricas, por via independente da hemoglobina.

Apesar de existirem relatos de sua aplicação clínica há cinco décadas no mundo e há quatro no Brasil, existem poucas publicações da aplicação da OH nas doenças hepáticas (Ponikvar et al., 1998; Mazariegos et al., 1999; Liu et al., 2002; Nazyrov et al., 2002; Ozden et al., 2004).

2 Revisão da literatura

A prevenção e controle do sangramento durante hepatectomias pela a oclusão total do pedículo hepático (Pringle, 1908), e a exclusão vascular do fígado (Heaney et al., 1966; Huguet et al., 1978) são técnicas ainda muito utilizadas. Entretanto, a isquemia decorrente da interrupção do fluxo sanguíneo para o fígado é uma das causas de disfunção hepática pós-operatória.

Como forma de minimizar os efeitos deletérios da isquemia no fígado, foram desenvolvidas diversas variações técnicas como oclusão intermitente do pedículo hepático (Makuuchi et al., 1987; Isozaki et al., 1992), pré-condicionamento isquêmico (Lloris-Carsi et al., 1993), ligadura seletiva intra-hepática do pedículo (Launois e Jamieson, 1992) e oclusão intra-parenquimatosa de ramo da veia porta por balão (Shimamura et al., 1986; Castaing et al., 1989).

O fígado pode ser submetido a isquemia normotérmica, hipotérmica ou mista. Na isquemia normotérmica, também denominada quente, o fígado fica privado de perfusão, drenagem venosa ou de ambos; mantendo-se o órgão na temperatura ambiente durante o procedimento operatório.

Durante o período isquêmico o consumo de ATP continua e sua síntese se dá por glicólise anaeróbica. Nesta situação, ocorre acidose intracelular, decorrente do acúmulo citoplasmático de lactato (Woods e Krebs, 1971). Com o esgotamento das reservas de ATP, as células utilizam o difosfato de adenosina (ADP) e o monofosfato de adenosina (AMP) como fonte de energia, aumentando a concentração intracelular de adenosina, que deixa a célula por difusão passiva pela membrana celular. Com o tempo, ocorre produção de xantina e hipoxantina, que, combinada ao oxigênio, na presença da xantina oxidase, leva a formação de espécies reativas de oxigênio, lesivas às membranas celulares (Clavien et al., 1992).

Histologicamente, na isquemia normotérmica ocorre vacuolização citoplasmática, congestão sinusoidal e, dependendo de sua duração focos de necrose e infiltração gordurosa (Orrenius et al., 1976; Carvalho et al., 1978; Shibayama et al., 1991).

A isquemia hipotérmica, também denominada fria, ocorre nas situações em que, juntamente com a interrupção sanguínea para o órgão, se realiza o resfriamento do parênquima hepático por contato direto ou por injeção intravascular de soluções geladas. É um método consagrado de preservação de órgãos para transplante e também utilizado em grandes ressecções hepáticas com previsão de períodos longos de isquemia.

O resfriamento do fígado, embora capaz de reduzir a demanda metabólica hepática em até 95%, tem inúmeros efeitos deletérios. O metabolismo celular é reduzido, mas não interrompido. Ocorrem reações originadas do esgotamento do ATP, agregação de leucócitos e plaquetas ao endotélio e formação de espécies reativas de oxigênio. Temperaturas abaixo de 20°C também estão associadas com disfunção da bomba de sódio-potássio, com desequilíbrio osmótico e eletrostático entre os meios intra e extracelular, e edema celular (Clavien et al., 1992; Busuttil e Klintmalm, 2005).

Estudos sugerem que lesões decorrentes de isquemia hepática hipotérmica podem ser atribuídas em grande parte às alterações das células endoteliais sinusoidais (Clavien et al., 1992; Urata et al., 1997). Estas células quando mantidas em baixas temperaturas acumulam concentrações elevadas de cálcio, resultando em aumento de atividade da calpaina (Upadhyya et al., 2003), que causa desarranjo das fibras actínicas de estresse. Este desarranjo induz liberação de metaloproteinases da matrix pelas células endoteliais sinusoidais levando a expressão de receptores para plaquetas e leucócitos na superfície celular (Upadhyya e Strasberg, 2002). Quando o fígado é reperfundido, estas alterações causam aderência endotelial e ativação de plaquetas e leucócitos com coagulação intra-sinusoidal e extenso processo inflamatório do órgão.

Na isquemia mista o fígado fica exposto a temperaturas variadas durante o tempo de oclusão, sendo o transplante hepático seu modelo mais conhecido. Neste, durante o período compreendido entre a hepatectomia do doador e a reperfusão do órgão no receptor, o tecido hepático sofre alterações decorrentes da privação de oxigênio celular e da hipotermia. É denominada: lesão de preservação. Todas as células hepáticas sofrem danos com a isquemia fria, mas parece que as células não parenquimatosas (células de Kupffer, endoteliais e de Ito) são mais susceptíveis que os hepatócitos (Gao et al., 1998). Como consequência desta agressão tecidual, pode ocorrer desde disfunção hepática leve, manifestada apenas por pequeno aumento no nível sérico das aminotransferases, até falência completa do enxerto, com necessidade de retransplante de urgência. Estas lesões podem ser minimizadas com o resfriamento do órgão (Collins et al., 1969; Ross et al., 1976), a infusão intravascular de soluções de conservação de órgãos e tecidos (Kalayoglu et al., 1988; Belzer e Southard, 1988; Jamieson et al., 1989), a diminuição do tempo de isquemia (Furukawa, 1991), e o uso de imunossupressores (Laurens et al., 2006).

O conhecimento de que os efeitos nocivos da isquemia tecidual se prolongam e até mesmo se acentuam após a reperfusão foi demonstrado em estudo experimental no qual a lesão em mucosa ileal produzida por período isquêmico de três horas seguido por uma hora de reperfusão foi maior que após quatro horas de isquemia sem reperfusão (Parks e Granger, 1986). Este trabalho impulsionou novos estudos na pesquisa dos fatores determinantes da então denominada LIR tecidual, posteriormente descrita em órgãos como coração (Schaper e Schaper, 1983), pulmões (Takayama et al., 1987; Paull et al., 1989), rins (Ratych et al., 1986), e cérebro (Uematsu et al., 1989).

A LIR hepática ocorre em duas fases distintas. A primeira ocorre nas primeiras horas após a reperfusão e está associada à produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de Kupffer ativadas e pela redução da cadeia respiratória nos hepatócitos e células endoteliais

sinusoidais (González-Flecha et al, 1993; Kobayashi e Clemens, 1992; Cutrin et al., 1998). Na fase subsequente, após seis a 24 horas, ocorre intenso processo inflamatório, mediado por oxidantes originados de células extra-hepáticas.

A isquemia leva a alterações das células endoteliais sinusoidais, que expressam grande número de moléculas de adesão de superfície e antígenos do complexo de histocompatibilidade maior, pré-condicionando o endotélio para inter-relações posteriores com os neutrófilos. Entre as moléculas expressas nas células endoteliais, merecem destaque as seletinas P e E e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e, nos leucócitos se destacam as integrinas beta-1 e beta-2. A ação conjunta destas moléculas ocasiona aderência firme entre leucócitos, plaquetas e células endoteliais, causando distúrbio microvascular, com extravasamento e migração de células inflamatórias para o tecido lesado (Jaeschke, 1997; Yadav et al., 1999). Após extravasamento e transmigração dos neutrófilos, os hepatócitos se aderem a estas células, sob o intermédio das integrinas beta-2 e ICAM-1 expressas nos hepatócitos (Nagendra et al., 1997). Uma vez aderido, o neutrófilo destrói o hepatócito pela ação de enzimas tóxicas como elastase, serino-protease e metaloproteinases além da produção de espécies reativas de oxigênio. O uso de anticorpos anti-ICAM-1 em modelo experimental em ratos mostrou atenuação da LIR em animais com fígado normal e esteatótico (Nakano et al., 1997). Também o bloqueio da interação da seletina P com neutrófilos polimorfonucleares mostrou importante efeito protetor em ratos com fígado esteatótico submetidos a isquemia e reperfusão (IR) (Amersi et al., 2002).

Além das células endoteliais, outra célula não parenquimatosa envolvida da LIR do fígado é a célula de Kupffer. Trata-se de macrófago residente encontrado no espaço sinusoidal, resistente a isquemia. É ativado durante o período de reperfusão, produzindo espécies reativas de oxigênio, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de agregação plaquetária, fator de necrose tumoral (TNF), Interferon-gama, aumentando a expressão de

ICAM-1 e seletina-P nas células endoteliais e ativando outras células de Kupffer e neutrófilos circulantes (Hisama et al., 1996; Lentsch et al., 1998; Shigeeki e Masayuki, 2000).

Estudos sugerem que a IR do fígado aumenta a produção e a atividade da caspase-3 (cisteinase especificamente envolvida nas fases de iniciação e execução do processo de apoptose) no tecido hepático causando morte celular por apoptose de até 50% a 70% das células endoteliais e de 40% a 60% dos hepatócitos (Sasaki et al., 1996; Gao et al., 1998; Cursio et al., 1999; Kohli et al., 1999). No entanto, Gujral (2001) em estudo experimental concluiu que a morte celular na LIR do fígado ocorre por necrose e que a utilização de um inibidor da caspase-3 não diminuiu os achados histopatológicos nos animais tratados quando comparados ao grupo controle.

A sugestão da participação de anticorpos no processo da LIR surgiu de observações em estudos em animais submetidos a IR, nos quais a inibição do complemento limitou a lesão. (Buerke et al., 1995; Weiser et al., 1996; Williams et al., 1999). O complexo de ataque à membrana parece ser elemento terminal da lesão causada pelo complemento (Kyriakides et al., 1999; Austen et al., 1999; Chan et al., 2003; Heijen et al., 2005).

As duas principais citocinas implicadas na LIR do fígado são TNF-alfa e IL-1. Ambas induzem a síntese de interleucina-8 (IL-8) e regulam a expressão de moléculas de adesão, permitindo a interação entre endotélio e leucócitos. TNF-alfa atua na quimiotaxia e ativação de neutrófilos e estimula a produção de superóxidos pelas células de Kupffer. A IL-1 induz as células de Kupffer a produzir TNF-alfa, além de regular a produção de radicais livres pelos neutrófilos. Sugere-se que o mecanismo por meio dos quais os imunossupressores atenuem a LIR do fígado seja por meio da modulação da produção de TNF, já que as concentrações séricas de TNF estão claramente diminuídas em animais tratados com imunossupressores e submetidos a IR. O uso de bloqueador dos receptores de IL-8, inibiu em 96% a infiltração de neutrófilos após 24 horas de reperfusão (Cavalieri et al., 2005).

Existem vários métodos de prevenção e tratamento da LIR do fígado. Estes podem ser divididas em duas diferentes categorias: intervenções cirúrgicas e uso de agentes farmacológicos.

O pré-condicionamento isquêmico é intervenção cirúrgica efetiva e segura na prevenção da LIR do fígado (Clavien et al., 2000; 2003). Consiste em se realizar períodos curtos de isquemia seguidos por reperfusão, no período imediatamente anterior à oclusão prolongada do pedículo hepático. Baseia-se na descoberta de que os tecidos adquirem resistência aos efeitos deletérios da IR por meio da exposição prévia a breves períodos de oclusão vascular. Murry (1986) descreveu o primeiro relato desta técnica na isquemia miocárdica. Seus efeitos protetores na LIR foram descritos no fígado (Lloris-Carsí et al., 1993; Hard et al., 1996; Peralta et al., 1996; Yadav et al., 1999; Clavien et al., 2000; Jassen et al., 2006; Azoulay, 2006), músculos esqueléticos (Pang et al., 1995), cérebro (Glazier et al., 1994), medula espinhal (Sakurai et al., 1998), rins (Turma e Bates, 1997), retina (Roth et al., 1998), pulmões (Du et al., 1996) e intestino (Hotter et al., 1996).

A base molecular dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico se baseia em uma série de eventos em cascata. Em resposta a isquemia hepática, são produzidas várias substâncias que têm capacidade de ativar mecanismos protetores, sendo a adenosina reconhecida como a principal delas (Peralta et al., 1996, 1997). A adenosina é liberada no espaço extracelular em grande quantidade como produto da ação enzimática no ATP, ADP e AMP, segundos após o início da isquemia. Ela interage com receptores endoteliais, inibindo o metabolismo oxidativo e adesão endotelial dos leucócitos, aumenta a estabilidade da membrana celular e a produção de energia e finalmente reduz o influxo de cálcio pela ativação de canais de potássio ATP-dependentes (Cronstein et al., 1986; Howell et al., 2000). A adenosina deaminase ou antagonistas de receptores de adenosina, são capazes de abolir os efeitos protetores do pré-condicionamento isquêmico no fígado (Peralta et al., 1999).

O pré-condicionamento isquêmico do fígado diminui também o acúmulo de xantina e a conversão de xantina-desidrogenase a xantina oxidase, prevenindo assim a produção de espécies reativas de oxigênio e consequente lesão hepática (Fernandez et al., 2002).

O uso da oclusão intermitente do pedículo hepático em cirurgias que necessitam de longos períodos de isquemia também mostrou ser eficiente na proteção da LIR do fígado (Makuuchi et al., 1987; Belghiti et al., 1999). Estudo comparando o uso desta técnica com o pré-condicionamento mostrou resultados semelhantes (Rudiger et al., 2002).

Vários agentes farmacológicos já foram descritos como protetores contra a LIR do fígado. Eles incluem substâncias antioxidantes (Atalla et al., 1985; Baker et al., 1985; Frederiks et al., 1995; Abdo et al., 2003), inibidores das proteases (Li et al., 1993), imunossupressores (Kurokawa et al., 1992; Kawano et al., 1994), agonistas de receptores da adenosina (Nakayama et al., 1999), doadores de óxido nítrico como a L-arginina (Cottart et al., 1999), pentoxifilina (Rudiger e Clavien, 2002), inibidores da caspase (Cursio et al., 1999) e inibidores da ação do fator de ativação plaquetária (Boin, 1997).

O uso científico da câmara hiperbárica de oxigênio na prática clínica iniciou em meados do século XX por Churchill-Davidson, pioneiro na utilização desta modalidade terapêutica em pacientes com seqüelas de radioterapia para tratamento do câncer (Churchill-Davidson et al., 1955).

Atualmente a terapêutica com OH consiste na inalação intermitente de oxigênio a 100% sob pressão superior a uma atmosfera.

Em ar ambiente, a hemoglobina está saturada, em 98% de oxigênio (19,7 vol% de oxigênio, dos quais aproximadamente 5,8 vol% são extraídos dos tecidos), proporcionando sua concentração dissolvida no plasma de 0,32 vol%. A Lei de Boyle postula que o volume de um gás, sob temperatura constante, é inversamente proporcional à pressão exercida sobre este. O aumento isolado da pressão do ambiente tem impacto desprezível no conteúdo total de

oxigênio presente na hemoglobina, já que a saturação desta encontra-se no limite superior. A oferta de oxigênio inspirado a 100% aumenta a concentração de oxigênio dissolvido no plasma sanguíneo para 2,09 vol%. Quando associado ao aumento da pressão ambiente para 2,5 atmosferas, sua concentração no plasma alcança 6,8 vol%, efeito que, teoricamente, viabilizaria a atividade metabólica celular sem a presença da hemoglobina, sendo o principal mecanismo de ação da OH (Grim et al., 1990).

A OH oferece grande aumento da concentração tecidual de oxigênio em feridas hipoperfundidas e infectadas, o que proporciona cicatrização eficiente por meio de aumento da replicação dos fibroblastos e síntese do colágeno, do processo de neovascularização local do tecido isquêmico e aumento de atividade bactericida dos leucócitos (La Van e Hunt, 1990; Niinikoski, 2004). Pacientes diabéticos com feridas em membros inferiores de difícil cicatrização têm benefício do uso diário da OH por 30 a 60 dias (Davis, 1987). Pacientes com fasciíte necrosante têm recuperação mais rápida e menor mortalidade quando comparado ao tratamento clínico-cirúrgico convencionais associa-se OH (Riseman et al., 1990). Além destas indicações, a OH tem demonstrado ser eficiente no tratamento de queimaduras térmicas (Cianci et al., 1988), osteomielites (Esterhai et al., 1986), intoxicação por monóxido de carbono (Thom et al., 1995; Leach et al., 1998) e embolia gasosa (Kindwall et al., 1988).

Há relatos da aplicação clínica de OH em doenças hepáticas como hepatites crônicas virais (Liu et al., 2002), insuficiência hepática pós-operatória em cirróticos (Nazyrov et al., 2002), isquemia arterial pós-transplante hepático (Mazariegos et al., 1999), hepatite aguda fulminante (Ponikvar et al., 1998) e após hepatectomia parcial (Ozden et al., 2004).

O uso da OH em ratos submetidos à ligadura de veias hepáticas reduziu a mortalidade pós-operatória e atenuou as alterações histológicas (Rosário, 2004).

A aplicação da OH no tratamento e prevenção da LIR de órgãos como testículos (Kolski et al., 1998), intestino delgado (Yamada et al., 1995) e miocárdio (Sterling et al., 1993) demonstrou-se benéfica.

Os efeitos bioquímicos e celulares da OH na LIR do fígado ainda não estão totalmente esclarecidos. Inicialmente, acreditava-se que a OH poderia exacerbar as lesões, por aumentar a oferta de oxigênio ao organismo, gerando aumento de radicais livres (Benke, 1988). No entanto, estudos subsequentes demonstraram que a OH durante a reperfusão tem efeitos benéficos (Kaelin et al., 1990; Zamboni et al., 1992). A OH diminui a aderência endotelial dos neutrófilos pós LIR, através de menor expressão de ICAM-1 nas células endoteliais (Hong, 2003). A OH aumentou a concentração tecidual de enzimas antioxidantes como catalase (Kim et al., 2001) e superóxido-dismutase (Wada et al., 2001). Estudos em ratos evidenciaram efeitos protetores do pré-condicionamento por OH na LIR do fígado (Chen, 1998; Yu, 2005). Aplicação de OH após o início da reperfusão, em ratos submetidos a IR hepática, atenuou infiltração leucocitária do parênquima hepático e diminuiu a mortalidade (Kihara et al., 2005).

Apesar de seus conhecidos efeitos benéficos, a OH pode gerar danos orgânicos irreversíveis. Alta concentração tecidual de oxigênio causa redução do fluxo sanguíneo arterial (Bird e Telfer, 1965; Hordnes e Tussebotn, 1985). O efeito tóxico do oxigênio ao pulmão tem relação direta com o tempo de exposição, com sua concentração e se expressa clinicamente com diminuição do volume expirado (Clark e Lambertsen, 1971; Thorsen et al., 1998). Estas alterações podem persistir por até três anos (Thorsen e Kambestad, 1995). Como nos protocolos de OH os pacientes raramente permanecem por mais de duas horas em tratamento, o risco de lesões pulmonares pelo oxigênio é baixo e não há relato deste tipo de lesão na prática clínica.

Cavidades do organismo preenchidas por ar, tais como ouvido médio, seios paranasais e ocasionalmente dentes, quando têm sua comunicação com o ambiente bloqueada, estão sujeitas a barotrauma durante a OH, sendo desaconselhável seu uso eletivo em pacientes com sintomas gripais (Carlson et al., 1992). São descritas outras complicações, como cefaléia, dor no ouvido, embolia gasosa, parada cardio-respiratória, tonteiras e pneumotórax maciço (Kindwall, 1999).

A OH está contra-indicada nos pacientes em uso de Doxorubicina (Upton et al., 1986) e Bleomicina (Gilson e Sahn, 1985) pelo risco de complicações cardiovasculares. Como são medicamentos utilizados com frequência em pacientes com câncer, seu uso deve ser afastado na anamnese.

3 Objetivo

Estudar os efeitos do pré-condicionamento hepático por OH na LIR do fígado, pela avaliação da concentração sérica de AST, ALT e DHL, da pressão intra-arterial sistêmica e da concentração tecidual de mieloperoxidase (MPO) no fígado e pulmão, após IR hepática normotérmica seletiva em ratos.

4 Método

4.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) Wistar, machos, com idade entre três e quatro meses, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, receberam ração balanceada própria para ratos (Purina, Campinas-SP) e água potável *ad libitum*. No biotério, foi respeitado o ritmo circadiano dos animais e mantidas condições sanitárias adequadas. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno de 40cm x 30cm x 17,5cm com teto de grade metálica, em número máximo de cinco animais por gaiola. O fundo das gaiolas recebeu forração de serragem de madeira.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo número 089/05).

4.2 Divisão dos grupos

Os 32 animais foram distribuídos em quatro grupos de oito. Cada grupo foi submetido aos seguintes procedimentos:

- Grupo A (n=8): Laparotomia e manipulação do pedículo hepático.
- Grupo B (n=8): Laparotomia, oclusão do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado por 30 minutos e reperusão por 30 minutos.

- Grupo C (n=8): OH a 2,5 atm por 90 minutos, laparotomia, oclusão do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado 30 minutos e reperfusão por 30 minutos.
- Grupo D (n=8): Exposição ao ar ambiente a 2,5 atm por 90 minutos, laparotomia, oclusão do pedículo vascular dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado por 30 minutos e reperfusão por 30 minutos.

4.3 Tratamento hiperbárico

As sessões de tratamento hiperbárico foram realizadas em câmara hiperbárica multipacientes modelo A 240 (Seaway Diver Ind Met e Mont Ltda, Santa Rosa, RS, BR) entre oito e dez horas da manhã, em grupos de dois animais por sessão. No interior do equipamento foi colocada gaiola de polipropileno de 40 cm x 30 cm x 17,5 cm revestida por saco plástico com dois orifícios, um para a entrada do oxigênio e outro para saída do ar.

Os animais do grupo C foram submetidos à pressão de 2,5 atm, com oferta de oxigênio a 100% por 60 minutos. O tempo total da sessão foi de 90 minutos, devido à compressão e descompressão atmosférica gradativa, com duração de 15 minutos, cada.

Os animais do grupo D foram submetidos a pressão de 2,5 atm, em ar ambiente por 60 minutos. O tempo total da sessão foi de 90 minutos, devido à compressão e descompressão atmosférica gradativa, com duração de 15 minutos, cada.

4.4 Procedimento cirúrgico

4.4.1 Técnica anestésica

Os ratos foram anestesiados por aplicação intraperitoneal de cloridrato de xylasina a 2% na dose de 15 mg/kg e cloridrato de ketamina a 5% na dose de 90mg/kg. Os animais

foram considerados anestesiados após verificação da perda dos reflexos córneo-palpebral e de retirada da pata traseira ao estímulo doloroso por preensão.

Doses adicionais foram usadas durante o procedimento operatório, quando o animal expressava sinais de recuperação dos reflexos citados.

4.4.2 Técnica operatória

Os animais foram submetidos a intubação orotraqueal com cateter para acesso vascular 14G (Becton Dickinson Ind. Cer. Ltda, Juiz de Fora, MG). A temperatura retal foi mantida entre 36°C e 37°C com auxílio de colchão térmico durante o procedimento operatório.

Posicionamento dos animais em decúbito dorsal horizontal. Tonsura dos pêlos da região abdominal seguida de anti-sepsia das regiões abdominal e cervical ventrais com solução de povinilpirrolidona iodo a 1% (Cincord Sul Química e Farmacêutica, Riberão Preto, SP).

Cervicotomia longitudinal mediana com bisturi e tesoura para isolamento da artéria carótida esquerda e veia jugular direita.

A artéria carótida esquerda foi dissecada e canulada com cateter de polipropileno PE 10 (Clay Adams, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), para obtenção dos valores pressóricos arteriais e colheita de amostras de sangue durante o procedimento operatório.

A veia jugular direita foi dissecada e cateterizada com cateter de polipropileno PE 10 (Clay Adams, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), para infusão de solução de NaCl 0,9%.

Os animais foram submetidos a ventilação mecânica pela conexão do cateter orotraqueal a ventilador mecânico para roedores (C.F. Palmer, London, UK) com os seguintes

parâmetros respiratórios: frequência respiratória de 60 incursões por minuto e volume de ar corrente de 1,5 ml/100g de peso.

Realizada incisão da parede abdominal por planos, com bisturi frio e tesoura, na linha mediana, do apêndice xifóide à cicatriz umbilical, com exposição da cavidade peritoneal.

Os lobos esquerdo e mediano do fígado foram identificados e liberados por divulsão dos ligamentos hepáticos. O pedículo dos lobos mediano e lateral esquerdo do fígado, contendo o ducto biliar, artéria hepática e veia porta, foi ocluído por 30 minutos, utilizando microclampe para aneurisma cerebral (Yasargil FE-751, Aesculab / Alemanha) . Após este período o clampe foi retirado e os lobos isquemiados reperfundidos.

Após 30 minutos de reperfusão foi realizada a exérese do lobo lateral esquerdo do fígado e o lobo inferior do pulmão direito. Estas amostras foram lavadas com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, pesadas e imediatamente resfriadas a -80°C para posterior análise da MPO tecidual.

Durante todo o procedimento operatório foi realizada hidratação venosa com solução de NaCl 0,9% na dosagem de 45 ml/kg/h. Após cada colheita de sangue foi infundida a quantidade de 1,8 ml de solução de NaCl 0,9%.

4.5 Colheita de sangue

Para dosagens bioquímicas foram colhidos 600 µL de sangue arterial dos animais de cada grupo, por aspiração pelo cateter da artéria carótida esquerda, imediatamente antes da oclusão do pedículo hepático (P), 30 minutos após a oclusão (I30) e 30 minutos após a reperfusão hepática (R30). Cada amostra de sangue foi submetida a centrifugação a 1600 g durante 15 minutos, a 4°C para separação do plasma. As amostras de plasma foram resfriadas a -80°C para análise bioquímica.

4.6 Monitorização pressórica

O cateter introduzido na artéria carótida esquerda foi conectado a transdutor de pressão (Transducer Amplifier, Model PM 1000, DATAQ Instruments, Inc. Software, Akron, OH, EUA) acoplado a computador com o programa WinDaq Pro Aquisition, versão 2,09 (DATAQ Instruments, Inc. Software, Adron, OH, EUA), e os níveis de pressão intra-arterial foram monitorizados durante o período intra-operatório.

4.7 *Análise bioquímica do sangue*

A avaliação das alterações sanguíneas da LIR do fígado foi realizada por dosagens séricas de AST, ALT e DHL, pelo método cinético otimizado por ultravioleta.

4.8 *Análise da concentração tecidual da mieloperoxidase*

Para dosagem da concentração tecidual de MPO, os fragmentos de pulmão e fígado previamente armazenados a -80°C foram descongelados em temperatura ambiente.

Amostras de 100 mg de tecido foram suspensas em 2,0 ml (4°C) de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO_4 , 0,015 M Na EDTA; pH 4,7), homogeneizadas por 10 minutos e centrifugadas a 4°C por 15 min a 10.000 g. O precipitado foi suspenso em 2,0 ml (temperatura ambiente) de tampão fosfato (0,05 M Na_3PO_4 , 0,5% brometo de hexadecyltrimethylamonio; pH 5,4) e novamente centrifugado a 4°C por 15 min a 10.000g. O sobrenadante foi congelado por três vezes consecutivas em nitrogênio líquido e centrifugado a 4°C por 15 minutos a 10.000g e o sobrenadante armazenado a -20°C .

Para o ensaio foram utilizados 25 μL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, dissolvidos em dimetilsulfóxido em concentração final de 1,6 mM, 100 μL de H_2O_2 , dissolvidos em tampão fosfato (0,05 M Na_2PO_4 , 0,5% brometo de hexadecyltrimethylamonio; pH 5,4) na concentração final de 0,03% v/v e 25 μL do sobrenadante das amostras.

A reação foi iniciada a 37°C por cinco minutos em microplacas com 96 poços pela adição de diluições seriadas do sobrenadante e da solução de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina. Após este período foi adicionada solução de H₂O₂ e realizada nova incubação a 37°C por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 4M H₂SO₄ e quantificada a 45nm no espectrofotômetro (Emax – Molecular Devices). A quantificação dos neutrófilos foi calculada de uma curva padrão baseada na atividade de MPO expressa por aumento de absorbância a 450nm de neutrófilos peritoneais induzidos em caseína a 5%, em ensaio paralelo.

O resultado foi expresso em número relativo de neutrófilos por miligrama de tecido.

4.9 *Análise estatística*

As variáveis analisadas foram pressão arterial média (PAM), AST, ALT, DHL e MPO hepática e pulmonar.

Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA), para elaboração de gráficos e análises estatísticas. O nível de significância adotado foi $p=0,05$.

Os resultados foram expressos nas tabelas e figuras como a média \pm desvio-padrão.

Usou-se a análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito do pré-condicionamento com OH e ar ambiente em alta pressão. Testou-se a validade das hipóteses necessárias à aplicação da ANOVA para todas as variáveis em que foi empregada. Nos casos em que a ANOVA indicou a existência de alterações significativas foram realizados como pós-testes o teste de desigualdade de Bonferroni e o de comparações múltiplas de Tukey. Nas variáveis em que não foi possível a realização de ANOVA foi utilizado o teste de Kruskal

Wallis, e nos casos em que o teste indicou a existência de alterações significativas foi realizado o teste de Dunns para comparações múltiplas.

5 Resultados

5.1 Peso dos animais

O peso dos animais variou de 275 g a 391g. Não houve diferença significativa do peso dos animais entre os grupos (FIG. 1).

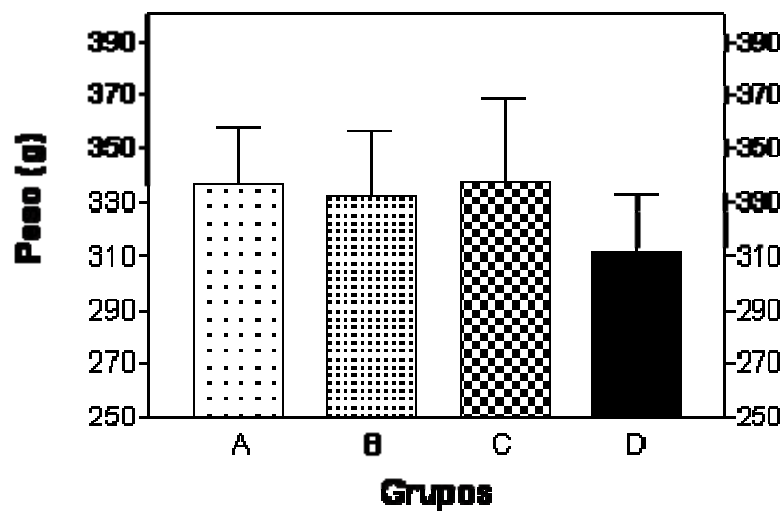


FIGURA 1 –Peso dos animais (n=8 animais/grupo).

Grupo A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático, grupo B - isquemia/reperfusão hepática, grupo C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática e grupo D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática. ($p > 0,05$).

5.2 Análise bioquímica do sangue

Na tabela (anexo 1) estão representados, respectivamente, os valores das médias e desvio padrão do nível sérico de AST, ALT DHL, dos animais dos grupos A, B, C e D nos diferentes tempos operatórios.

5.2.1 Aspartato-aminotransferase

Na FIG. 2 e anexo 1 estão representados os valores da variável AST (UI/L), obtidos nos animais dos grupos A, B, C e D.

Não se observou diferença significativa entre as médias do grupo A nos diferentes tempos P, I30 e R30.

Não se observou diferença significativa entre as médias nos tempos P e I30 nos grupos B, C e D, entretanto, as médias dos grupos B,C e D no tempo R30 foram maiores em relação às médias nos tempos P e I30 dos respectivos grupos ($p < 0,05$) e todas maiores que o grupo A.

Não se observou diferença significativa entre as médias dos grupos B,C e D no tempo I30.

Não se observou diferença significativa entre as médias dos grupos B,C e D no tempo R30.

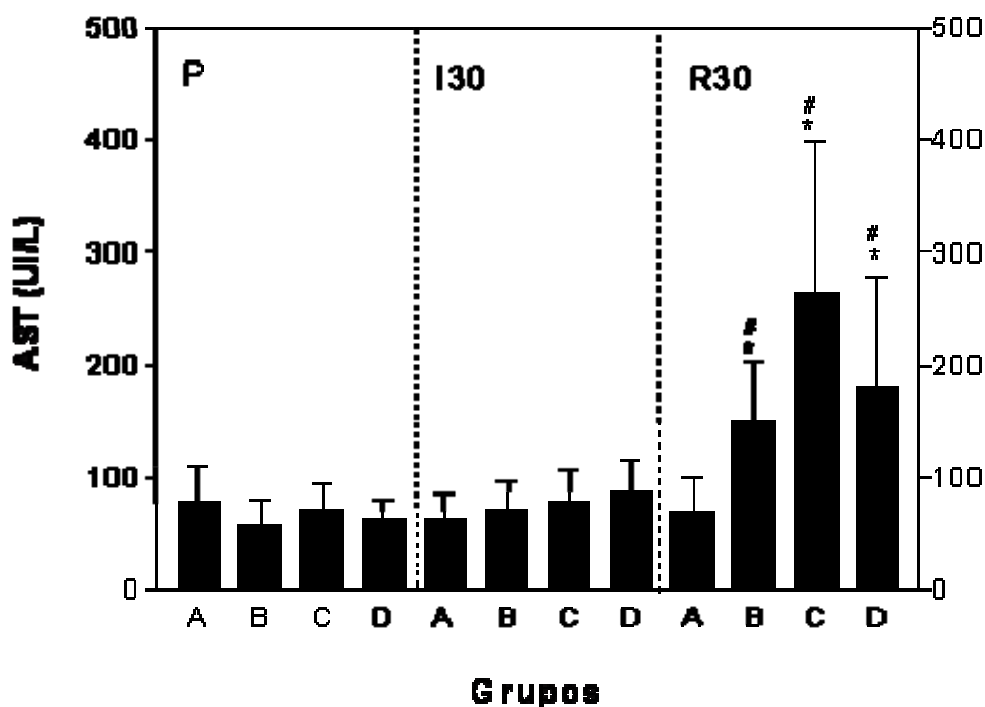


Figura 2 – Nível sérico de aspartato-aminotransferase (AST) dos animais durante o procedimento operatório (n = 8 animais/grupo).

Antes da isquemia (P), após 30 minutos de isquemia (I30) e após 30 minutos de reperusão (R30), nos animais dos grupos A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático; B - isquemia/reperusão hepática; C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperusão hepática; D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperusão hepática.

*($p < 0,05$) AST R30 comparado a AST P e AST I30 (teste de Kruskal-Wallis).

#($p < 0,05$) AST R30 comparado a AST R30 do grupo A (teste de Kruskal-Wallis).

As colunas representam a média e desvio padrão

5.2.2 Alanina-aminotransferase

Na FIG. 3 e anexo 1 estão representados os valores da variável ALT (UI/L), obtidos nos animais dos grupos A,B,C e D.

Não se observou diferença significativa entre as médias do grupo A nos diferentes tempos P, I30 e R30.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as médias nos tempos P e I30 nos grupos B, C e D, entretanto, as médias dos grupos B,C e D no tempo R30 foram maiores em relação às médias nos tempos P e I30 dos respectivos grupos ($p < 0,05$), e todas maiores que a média do grupo A.

A média no tempo R30 do grupo C foi maior que as respectivas médias dos grupos B e D ($p < 0,05$).

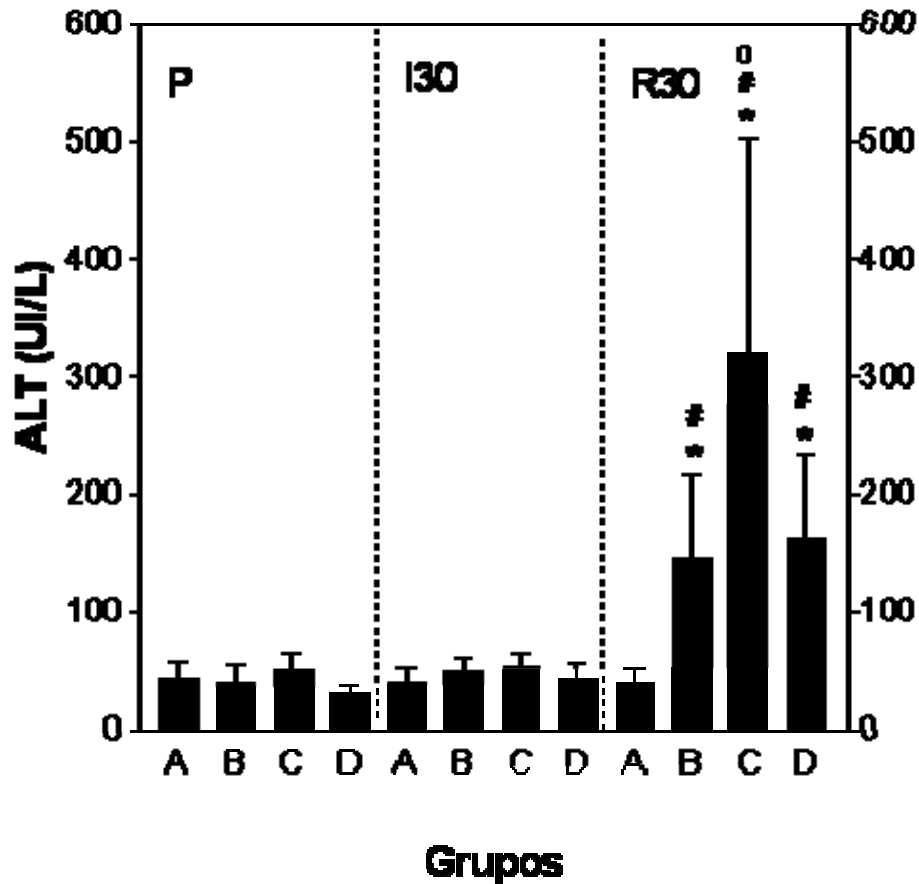


Figura 3 – Nível sérico de alanina-aminotransferase (ALT) dos animais durante o procedimento operatório ($n = 8$ animais/grupo).

Antes da isquemia (P), após 30 minutos de isquemia (I30) e após 30 minutos de reperfusão (R30), nos animais dos grupos A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático; B - isquemia/reperfusão hepática; C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática; D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática.

*($p < 0,05$) ALT R30 comparado a AST P e AST I30 (teste de Kruskal-Wallis).

#($p < 0,05$) ALT R30 comparado a AST R30 do grupo A (teste de Kruskal-Wallis).

o($p < 0,05$) ALT R30 do grupo C comparado ao ALT R30 dos grupos B e D (teste de Kruskal-Wallis).

As colunas representam a média e desvio padrão

5.2.3 Desidrogenase láctica

Na FIG. 4 e anexo 1 estão representados os valores da variável DHL (U/L), obtidos nos animais dos grupos A, B, C e D.

Não se observou diferença significativa entre as médias do grupo A nos diferentes tempos P, I30 e R30.

Não se observou diferença significativa entre as médias nos tempos P e I30 nos grupos B, C e D.

As médias dos Grupos B,C e D no tempo R30 foram maiores que a respectiva média do grupo A ($p < 0,05$).

As médias dos grupos B,C e D no tempo R30 foram maiores em relação às médias nos tempos P e I30 dos respectivos grupos ($p < 0,05$) e maiores que o grupo A.

Não se observou diferença significativa entre as médias dos grupos B,C e D no tempo R30.

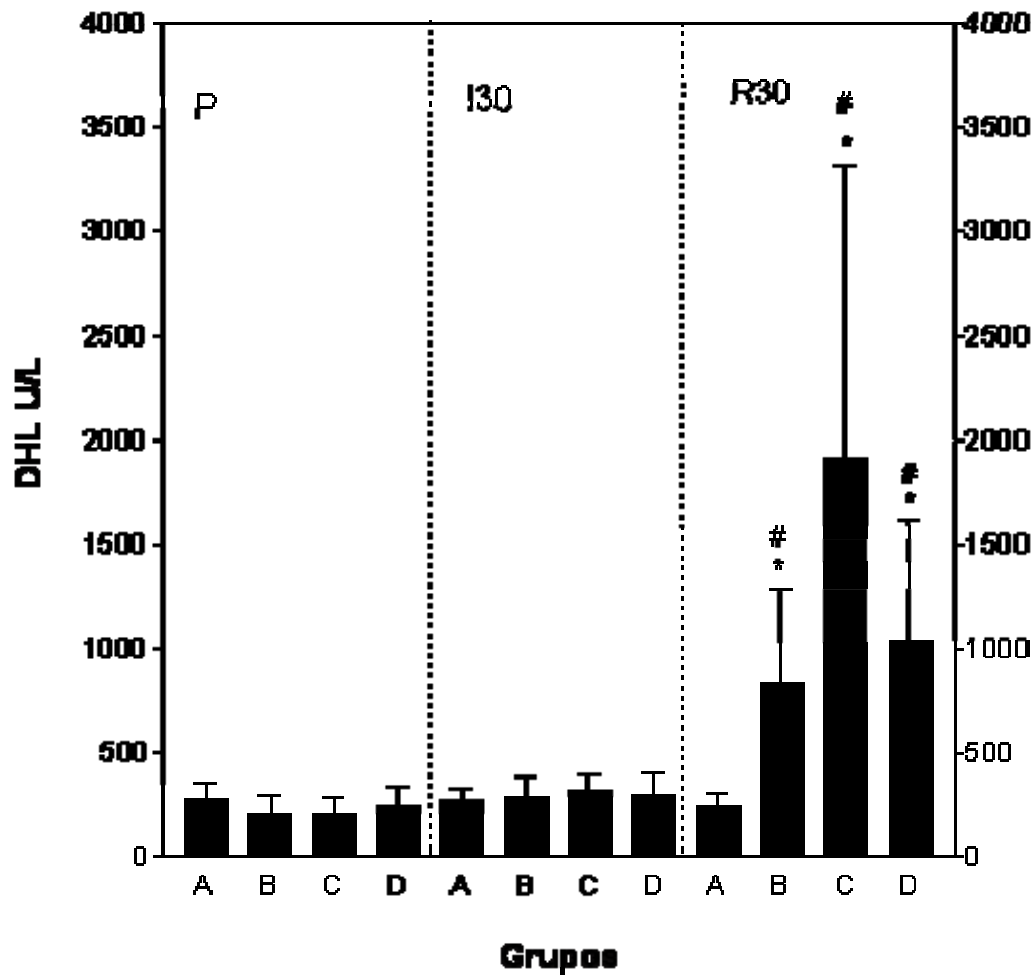


Figura 4 – Nível sérico de DHL dos animais durante o procedimento operatório (n = 8 animais/grupo).

Antes da isquemia (P), após 30 minutos de isquemia (I30) e após 30 minutos de reperfusão (R30), nos animais dos grupos A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático; B - isquemia/reperfusão hepática; C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática; D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática.

*($p < 0,05$) DHL R30 comparado a DHL C e DHL I30 (teste de Kruskal-Wallis).

#($p < 0,05$) DHL R30 comparado a DHL R30 do grupo A (teste de Kruskal-Wallis).

As colunas representam a média e desvio padrão

5.3 Pressão arterial média

As médias da PAM dos animais estão representadas na TAB. 1.

Não houve diferença significativa nas médias de PAM dos animais no início do experimento entre os grupos A,B,C e D.

Não houve diferença significativa nas medias de PAM durante os 60 minutos do experimento nos animais do grupo A.

Não houve diferença significativa entre a pressão arterial média antes e após a oclusão parcial do pedículo hepático nos grupos B,C e D.

Houve queda significativa da pressão arterial média aos cinco minutos de reperfusão no grupo B e durante toda a reperfusão nos grupos C e D ($p < 0,05$), em comparação as médias basais.

Tabela 1 - Pressão arterial média (mmHg) dos animais durante o procedimento operatório (n = 8 animais/grupo).

GRUPOS	Pressão arterial média								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	96,6 ± 11,4	93,1 ± 5,0	93,0 ± 14,6	99,6 ± 22,2	92,7 ± 14,0	89,5 ± 13,0	92,6 ± 11,2	94,8 ± 9,3	94,6 ± 11,4
B	106,8 ± 15,4	82,3 ± 23,6	90,9 ± 26,5	91,9 ± 19,1	85,1 ± 19,7	73,9 ± 16,2*	77,7 ± 20,1	79,9 ± 21,9	78,0 ± 28,3
C	106,7 ± 9,0	100,8 ± 11,1	99,1 ± 12,0	97,3 ± 18,3	88,1 ± 9,7	73,8 ± 6,1*	71,1 ± 17,9*	71,1 ± 5,9*	68,7 ± 3,6*
D	109,4 ± 17,9	94,6 ± 19,5	93,1 ± 16,5	104,1 ± 25,6	87,4 ± 13,2	73,1 ± 9,8*	70,1 ± 9,2*	75,8 ± 17,2*	70,9 ± 7,2*

Grupos: A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático, B - isquemia/reperfusão hepática, C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática e D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática.

Tempo de isquemia/reperfusão: 1 – antes da oclusão do pedículo hepático, 2 – aos 5 minutos de isquemia hepática, 3 – aos 10 minutos de isquemia hepática, 4 – aos 20 minutos de isquemia hepática, 5 – aos 30 minutos de isquemia hepática, 6 - aos 5 minutos de reperfusão hepática, 7 – aos 10 minutos de reperfusão hepática, 8 – aos 20 minutos de reperfusão hepática e 9 – aos 30 minutos de reperfusão hepática.

*($p < 0,05$) comparado a PAM do tempo 1.

Os valores representam a média±desvio padrão

5.4 Mieloperoxidase hepática

O acúmulo de neutrófilos no fígado após a reperfusão foi inferido pela dosagem da concentração da enzima MPO no lobo lateral esquerdo do fígado dos animais expressa como número relativo de neutrófilos por miligrama de tecido. Os valores estão representados na FIG. 6 e descritos no anexo 2.

O pré-condicionamento hepático por OH (grupo C) provocou aumento significativo na concentração média de MPO no parênquima hepático, em comparação com os grupos A, B e D. Não foi encontrada diferença significativa entre as médias dos grupos A, B e D.

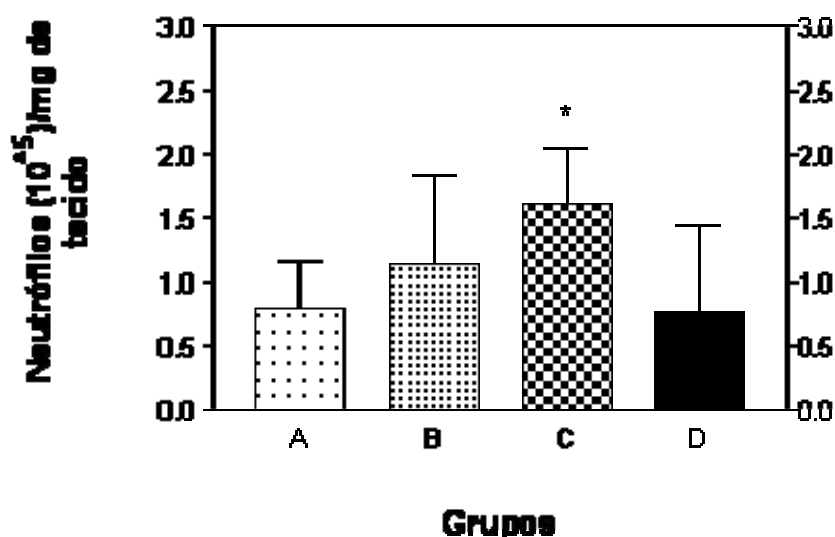


Figura 5 – Número relativo de neutrófilos/mg de tecido hepático após 30 minutos de isquemia hepática segmentar e 30 minutos de reperfusão hepática (n = 8 animais/grupo).

Grupos: A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático, B - isquemia/reperfusão hepática; C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática e D – pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática.

*(p < 0,05) comparado aos grupos A, B e D.

As colunas representam a média ± desvio padrão.

5.5 Mieloperoxidase pulmonar

O acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar foi avaliado pela análise da concentração de MPO no lobo inferior do pulmão direito dos animais expressa como número relativo de neutrófilos por miligrama de tecido. Os valores estão representados na FIG. 7 e descritos no anexo 2.

Os grupos B, C e D, de animais submetidos a IR hepática, apresentaram médias de níveis teciduais de MPO superiores ao grupo A ($P < 0,05$).

Os grupos C e D apresentaram valor médio de MPO maior em relação aos grupos A e B ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os grupos C e D.

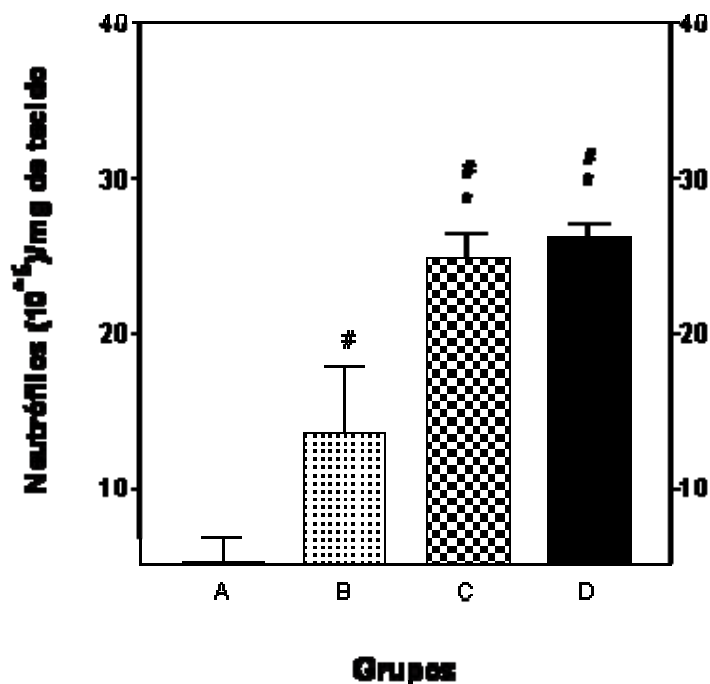


Figura 6 – Número relativo de neutrófilos/mg de tecido pulmonar após 30 minutos de isquemia hepática segmentar e 30 minutos de reperfusão hepática (n = 8 animais/grupo).

Grupos: A - laparotomia e manipulação do pedículo, B - isquemia/reperfusão hepática; C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática e D – pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática.

* ($p < 0,05$) comparado aos grupos A e B.

($p < 0,05$) comparado ao grupo A.

As colunas representam a média e desvio padrão.

5.6 Mortalidade

Não houve morte de animais durante o procedimento.

6 Discussão

A LIR do fígado, originada da privação temporária de fluxo sanguíneo e aporte de oxigênio ao parênquima hepático, baseia-se em complexa inter-relação entre os leucócitos, células de Kupffer, plaquetas e células endoteliais sinusoidais, com participação de proteases, lipoperoxidases, mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, complemento, entre outros (Jaeschke, 1997; Yadav et al., 1999; Chan et al., 2003; Miranda et al., 2004).

Buscando inibir estas alterações inflamatórias que se originam do binômio IR, vários métodos cirúrgicos, medicamentosos ou físicos têm sido utilizados: oclusão intermitente do pedículo hepático (Makuuchi et al., 1987; Isozaki et al., 1992), pré-condicionamento isquêmico (Lloris-Carsi et al., 1993), ligadura seletiva intra-hepática do pedículo (Launois e Jamieson, 1992), resfriamento do fígado (Collins et al., 1969; Ross et al., 1976), substâncias antioxidantes (Atalla et al., 1985; Baker et al., 1985; Frederiks et al., 1995; Abdo et al., 2003), inibidores das proteases (LI et al., 1993), imunossupressores (Sakr et al., 1990; Kurokawa et al., 1992; Kawano et al., 1994), agonistas de receptores da adenosina (Nakayama et al., 1999), doadores de óxido nítrico como a L-arginina (Cottart et al., 1999), pentoxifilina (Rudiger e Clavien, 2002), inibidores da caspatase (Cursio et al., 1999) e inibidores da ação do fator de ativação plaquetária (Boin, 1997).

O pré-condicionamento isquêmico, inicialmente descrito para diminuição dos efeitos da LIR do miocárdio (Murry, 1986), é método eficaz na profilaxia da LIR do fígado (Clavien et al., 2000; 2003).

No transplante hepático, o resfriamento do fígado associado à infusão intra-vascular de soluções de conservação de órgãos e tecidos são os métodos de escolha para se minimizar os efeitos da lesão de conservação (Kalayoglu et al., 1988; Belzer e Southard, 1988).

No presente estudo foi utilizado a OH como método de pré-condicionamento de ratos submetidos a isquemia hepática temporária seletiva e reperfusão e avaliou-se seu efeito na LIR do fígado por meio da dosagem sérica de AST, ALT e DHL, avaliação de variação de PAM e inferência do grau de infiltração leucocitária pela dosagem da MPO tecidual no fígado submetido à isquemia e no pulmão.

Optado por modelo experimental de isquemia hepática seletiva, como forma de se evitar os efeitos deletérios da oclusão total do pedículo, que causa congestão esplâncnica, pouco tolerada nesta espécie animal (De Baker, 1956). A oclusão total do pedículo é apropriada para estudos em que a curva de sobrevivência constitui variável a ser avaliada (Kohli et al., 1999).

Estudos foram realizados com tempos de isquemia hepática que variam de 30 minutos a 4 horas e com tempos e formas de reperfusão variáveis (Marubayashi et al., 1997; Boin, 1997; Quireze, 2002). Em todos os modelos houve alterações das enzimas hepáticas poucos minutos após a reperfusão. No presente estudo foi escolhido tempo de 30 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão, suficientes para causar alterações séricas de aminotransferases e infiltração leucocitária nos tecidos.

Estudos recomendam anticoagulação sistêmica por injeção endovenosa de heparina, forma de se evitar trombose vascular secundária a oclusão do pedículo hepático, (Colleti et al., 1996; Marubayashi et al., 1997). No entanto, estudos recentes contestam esta afirmativa (Kohli et al., 1999; Peralta et al., 2001). Diante da inexistência de padronização com relação ao seu emprego, e como forma de se evitar sangramento per-operatório, optou-se pela não utilização da anticoagulação sistêmica no presente estudo.

A opção pela utilização exclusiva de ratos machos se deu com o objetivo de se ter os grupos homogêneos já que o grau da LIR pode variar com sexo (Ping, 2005).

Foi realizada reposição hídrica dos animais com solução de NaCl 0,9% com o objetivo de evitar que os efeitos da hipovolemia pelas perdas originadas da exposição da cavidade peritoneal, respiração artificial, colheitas de sangue, transpiração e diurese pudessem somar aos efeitos deletérios da isquemia e da reperfusão do fígado.

As aminotransferases (AST e ALT) são enzimas que, em concentrações elevadas, indicam lesão hepatocelular, apontando alterações de permeabilidade da membrana citoplasmática. A DHL, enzima presente em quase todos os tecidos e com concentração sérica elevada em situações de agressão celular, tem alta sensibilidade, porém, baixa especificidade para indicar qual órgão está acometido (Reichling e Kaplan, 1988; Sherlock e Dooley, 1997).

No presente estudo, os valores séricos basais dessas enzimas foram similares entre os grupos demonstrando que, a OH, isoladamente, não causou lesão hepatocelular significativa. Este achado está em acordo com a literatura, que sugere que o efeito do pré-condicionamento por OH seja baseado em estresse oxidativo, que termina antes da formação de AST e ALT (Yu et al., 2005). A isquemia hepática não aumentou a concentração sérica de AST, ALT e DHL. Quando avaliados os valores de AST, ALT e DHL após reperfusão, houve aumento significativo em comparação com os períodos pré e pós-isquêmicos. Embora as concentrações séricas de AST, ALT e DHL após reperfusão, tenham sido maiores no grupo de animais submetidos previamente à OH, só foi encontrada diferença significativa de ALT. Deste achado pode-se inferir que, em nosso estudo, o uso prévio da OH potencializou lesão hepatocelular em ratos submetidos a IR. Estudos que utilizaram a OH como método de pré-condicionamento imediatamente antes (Yu et al., 2005) e seis horas antes (Chen et al., 1998) de isquemia hepática, não encontraram alterações nas concentrações séricas de AST e ALT após a reperfusão. A hipótese sugerida foi que ocorreria um possível aumento do nível sérico destas enzimas durante a fase de isquemia, influenciando os resultados após a reperfusão. Nosso estudo rejeita esta possibilidade, pois, não foram evidenciadas variações significantes

no nível sérico destas enzimas nas amostras sanguíneas colhidas ao término da isquemia. Nos trabalhos citados a colheita de sangue foi realizada antes da isquemia e após a reperfusão.

São esperadas alterações dos níveis da PAM após a oclusão do pedículo hepático, mesmo que segmentar, já que a interrupção do fluxo hepático causa estase sanguínea esplâncnica e diminui o retorno venoso ao coração, com conseqüente diminuição do débito cardíaco. O retorno do fluxo sanguíneo à porção isquemiada do fígado causa liberação de substâncias vasodilatadoras na circulação sistêmica, diminuição da resistência vascular periférica e conseqüente queda da pressão arterial. No presente estudo não houve queda significativa da PAM durante a isquemia hepática. Ocorreu queda significativa da PAM após a reperfusão hepática, rapidamente revertida nos animais submetidos a IR sem pré-condicionamento, porém persistente nos animais submetidos a pré-condicionamento por OH ou ar ambiente hiperbárico. Estes achados contradizem estudo experimental prévio, em animais submetidos a IR hepática imediatamente após OH, com um período de 60 minutos de isquemia e 120 minutos de reperfusão, no qual os animais tratados apresentaram menor queda dos níveis pressóricos após a reperfusão quando comparados ao grupo controle (Chen et al., 1988). Talvez, esta diferença se explique pela utilização de períodos de IR maiores que os utilizados em nosso estudo, o que causaria lesão tecidual mais intensa, exacerbando os efeitos hemodinâmicos da LIR.

As células de Kupffer têm papel central na LIR do fígado por serem as primeiras células citotóxicas e produzirem mediadores pró-inflamatórios tais como TNF- α e IL-6. Subseqüentemente, há transmigração de neutrófilos polimorfonucleares ativados no fígado. Pode-se utilizar dosagem tecidual de MPO como método de quantificação do acúmulo leucocitária (Bradley et al., 1982; Rivera-Chaves et al., 2001; Liu et al., 2004).

No presente estudo a concentração tecidual da MPO após reperfusão foi maior no fígado dos animais submetidos previamente à OH, em comparação aos outros. Deste modo,

pode-se inferir que esta alteração foi associada à OH e não ao aumento da pressão ambiental isoladamente. Não há na literatura estudo semelhante que avalie esta variável.

Baseado nos achados que após choque hemorrágico e síndrome do compartimento abdominal há grande infiltração de leucócitos no parênquima pulmonar (Resende Neto, 2003), o presente utilizou a infiltração de leucócitos no pulmão como variável de avaliação da OH na LIR.

A concentração tecidual da MPO foi maior no pulmão dos animais submetidos previamente à OH e ao ar ambiente hiperbárico. O resultado foi diferente do encontrado na avaliação do fígado e sugere que o ambiente hiperbárico causou aumento de infiltração leucocitária no pulmão após a reperfusão na LIR, embora não se possa excluir a participação do oxigênio. Na revisão da literatura não foram encontrados estudos da participação do pré-condicionamento OH nas alterações pulmonares da LIR hepática. Estudo experimental demonstrou que OH utilizada após a IR muscular induziu redução da concentração de leucócitos pulmonares (Zamboni et al., 1996).

O pré-condicionamento do fígado pela OH em ratos submetidos a isquemia hepática seletiva e reperfusão aumentou a concentração sérica de ALT, a concentração tecidual de MPO hepática e pulmonar e alterou a PAM durante o procedimento operatório. Estes resultados sugerem que o pré-condicionamento por OH agrava a lesão hepatocelular e agrava a infiltração leucocitária no fígado e pulmão na fase inicial da LIR do fígado. Deste trabalho, abrem-se diversas possibilidades de estudos aproveitando este modelo experimental, como os efeitos do pré-condicionamento por OH no nível sérico de TNF, interleucinas, complemento e no metabolismo hepático.

7 Conclusão

O presente trabalho permitiu concluir que o uso do pré-condicionamento por OH acentuou a LIR do fígado em ratos.

8 Summary

Liver ischemia/reperfusion injury (IR injury) is a cellular and immunological insult. It occurs in various clinical situations in which blood flow to the liver is interrupted. Hyperbaric oxygenation (HO) has been used as a treatment option in several ischemic diseases. However the effectiveness of this method as protective against IR injuries is controversial.

To determine the effect of HO in IR liver injury, a model of partial warm liver ischemia was used. Hilar area of the left lateral and medial hepatic lobes were clamped for 30' minutes followed by 30' reperfusion.

For the study was conducted on 32 male Wistar rats which divided into four groups of eight animals each: group A – animals submitted to laparotomy and liver manipulation, group B – animals submitted to IR, group C – animals pre-treated with 90 minutes of HO before IR and group C – animals pre-treated with room air at 2,5 atm absolute before IR. Before ischemia episode and after 30 minutes of reperfusion, plasma aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) analyses were performed. Intra-arterial blood pressure was monitored continuously. Myeloperoxidase (MPO) activity in liver and lung were assessed after 30 minutes of reperfusion.

AST, ALT and LDH increased after reperfusion in all the animals. ALT values and MPO activity in the liver parenchyma of HO pre-treated animals were higher than in groups A,B and D. Lung parenchyma MPO activity was higher in HO treated animal groups C and D. HO had negative hemodynamic effects during liver IR.

We conclude that liver preconditioning with HO aggravated liver IR injury in rats.

9 Referências bibliográficas

Abdo EE, Cunha JEM, Deluca P, Coelho AMM, Bacchella T, Machado MCC 2003, 'Protective effect of N2-mercaptpropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process', *Arq Gastroenterol*,40(3),177-80.

Amersi F, Farmer DG, Shaw GD, Kato H, Coito AJ, Kaldas F, Zhao D, Lassman CR, Melinek J, Ma J, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW 2002, 'P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury', *Am J Transplant*,2(7),600-8.

Asanua Y, SatoT, Yasui O, Kurodawa T, Koyama K 2003, 'Treatment for postoperative liver failure after major hepatectomy under hepatic total vascular exclusion', *J Artif Organs*, 6,152-6.

Austen WG Jr, Kyriakides C, Favuzza J, Wang Y, Kobzik L, Moore FD Jr 1999, 'Intestinal ischemia-reperfusion injury is mediated by the membrane attack complex', *Surgery*, 126,343-8.

Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagy M, Ichai P, Emoine A, Adam R, Castaing D 2006, 'Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study', *J Am Coll Surg*, 202(2),203-11.

Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM 2004, 'Production and in vivo effects of chemokines CXCL13/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice', *Inflamm Res*, 53,576-84.

Bedriow R, Golin V 2001, *Oxigenoterapia hiperbárica no doente cirúrgico*, in Rasslan S. O doente cirúrgico na UTI. São Paulo, Editora Ateneu, 493-502.

Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O 1999, 'Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study'. *Ann Surg* ,229(3),369-75.

Belzer FO, Southard JH 1988, 'Principles of solid-organ preservation by cold storage', *Transplantation*, 45,673-6.

Benke PJ 1988, 'Jessica in the well: ischemia and reperfusion injury', *JAMA*, 259,1326.

Bird AD, Telfer ABM 1965, 'Effect of hyperbaric oxygen on limb circulation', *Lancet*, 13(1),355-6.

Bismuth H, Sherlock DJ 1990, 'Revolution in liver surgery', *J Gast Hepatol, Suppl* 1, 95-109.

Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savina R, Terracciano L, Heim MH 2003, 'Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice', *Hepatology*, 38, 674-85.

Boin I.F.S.F. Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária em ratos wistar submetidos à isquemia hepática seletiva normotérmica e reperfusão. Campinas, 1997. Tese – Doutorado-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstaein G 1982, 'Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker', *J Invest Dermatol*, 78, 206-9.

Buerke M, Murohara T, Lefer AM 1995, 'Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion', *Circulation*, 91,393-402.

Busuttil RW, Klintmalm GK 2005. Transplantation of the liver 2nd ed.Philadelphia:Elsevier Inc.

Camargo CA, Cao W, Selvan RS, Clavien PA 1997, 'Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent', *Hepatology*, 26(6),1513-20.

Carlson S, Jones J, Brown M, Hess C 1992, 'Prevention of hyperbaric-associated middle ear barotrauma', *Ann Emerg Med*,21(12),70-72.

Castaing D, Garden J, Bismuth H 1989, 'Segmental liver resection using ultrasound-guided selective portal venous occlusion', *Ann Surg*, 210,20-3.

Cavalieri B, Mosca M, Ramadori P, Perrelli MG, de Simone L, Collota F, Bertini R, Poli G, Cutrim JC 2005, 'Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes', *Int J Immunopathol Pharmacol*,18(30),475-86.

Chan RK, Ibrahim SI, Verna N, Carroll M, Moore FD Jr, Hechtman HB 2003, 'Ischaemia-reperfusion is an event triggered by immune complexes and complement', *Brit J Surg*, 90(12),1470-78.

Chen MF, Chem HM, Ueng SW, Shyr MH 1998, 'Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury', *Liver*, 18, 110-6.

Churchill-Davidson I, Sanger C, Thomlinson RH 1955, 'High-pressure oxygen and radiotherapy', *Lancet*, 268(6874),1091-5.

Cianci P, Lueders H, Lee H, Shapiro R , Sexton J, Williams C, Green B 1988, 'Adjunctive hyperbaric oxygen reduces the need for surgery in 40-80% burns', *J Hyper Med*, 3,97-101.

Clark JM, Lambertsen CJ 1971, 'Pulmonary oxygen toxicity: a review', *Pharmacol Rev*, 23,37-133.

Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM 1992, 'Presevation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies', *Transplantation*, 53,957-78.

Clavien PA, Yadav SS, Sidram D, Bentley RC 2000, 'Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans', *Ann Surg*, 232,155-62.

Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W 2003, 'A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning', *Ann Surg*, 238(6),843-50.

Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kundel RG, Wilke CA, Strieter RM 1996, 'The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat', *Hepatology*, 23(3),506-14.

Collins GM, Bravo Shugarman M, Tersaki PI 1969, 'Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours'ice storage', *Lancet*, 2,1219-22.

Cottart C, Do L, Blanc M, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen F, Clot J 1999, 'Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion injury in rat livers', *Hepatology*, 29,809-13.

Court F, Wemyss-Holden S, Dennison AR, Maddern GJ 2002, 'The mystery of liver regeneration', *Br J Surg*, 89, 1089-95

Cronstein BN, Levin RL, Belanoff J, Weissman G, Hirschhorn. R 1986, 'Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells', *J Clin Invest*, 78,760-70.

Cutrin JC, Llesuy S, Boveris A 1998, 'Primary role of Kupffer cell-hepatocyte communication in the expression of oxidative stress in the post-ischaemic liver', *Cell Biochem Funct*, 16:65-72.

Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP 1999, 'A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis' *FASEB J*, 13(2),253-61.

Davis JC 1987, 'The use of adjuvant hyperbaric oxygen in treatment of the diabetic foot', *Clin Podiatr Med Surg North Am*, 4(2),429-37.

De Baker HC 1956, 'Ischaemic necrosis in the rat liver', *J Pathol Bacteriol*, 71(1),135-43.

Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P 1996, 'Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat', *J Heart Lung Transplant*, 15,1258-67.

Esterhai JL, Pisarello J, Brighton CT, Heppenstall RG, Gellman H, Goldstein G 1987, 'Adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the treatment of chronic refractory osteomyelitis', *J Trauma*, 27(7),763-8.

Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Peralta C 2002, 'Preconditionng protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase', *Hepatology*, 36(3),562-72.

Furukawa H, Todo S, Inventarza O, Casavilla A, Wu YM, Scotti-Foglieni C, Branznick B, Bryant J, Day R, Starzl TE 1991, 'Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution', *Transplantation*, 51(5), 1000-4.

Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA 1998, 'Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation', *Hepatology*, 27, 1652-60.

Gilson AJ, Sahn SA 1985, 'Reactivation of bleomycin lung toxicity following oxygen administration. A second response to corticosteroids', *Chest*, 55(2), 304-6.

Glazier SS, O'Rourke DM, Guaham DI, Welsch FA 1994, 'Induction of inschismic tolerance following brief focal ischemia in rat brain', *J Cereb Blood Flow Metab*, 14, 545-53.

González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A 1993, 'Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion', *J Clin Invest*, 91:456-64.

Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E 1990, 'Hyperbaric oxygen therapy', *JAMA*, 263(16), 2216-20.

Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaesehke H 2001, 'Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis?', *Hepatology*, 33, 397-405.

Hardy KJ, Mc Clure DN, Subwangcharoen S 1996, 'Ischemic preconditioning of the liver: a preliminary study', *Aust NZ J Surg*, 66,707-10.

Hart NA, Plaats AVD, Faber A, Leuvenink HGD, Olinga P, Wiersema-Buist J, Verkerke GJ, Rakhorst G, Ploeg RJ 2005, 'Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: an in vitro study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects', *Liver Transpl*, 11(11),1403-11.

Heaney JP, Stanton WK, Halbert DS, Seidel J, Vice T 1966, 'An improved technic for vascular isolation of the liver: experimental study and case reports', *Ann Surg*, 163(2),237-41.

Heijen BHM, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ, Hack CC, Van Gulik TM 2005, 'Inhibition of classical complement activation attenuates ischaemia and reperfusion injury in a rat model', *Clin Exp Immunol*, 143,15-23.

Henry JR, Chiamori N, Golub O, Berkman S 1960, 'Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-piruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase', *Am J Clin Pathol*, 34(4),381-98.

Higshigama H, Yamaguschi T, Mori K, Nakao Y 1993, 'Graft size assessment by intraoperative computed tomography in living related partial liver transplantation', *Br J Surg*, 80 , 489-92.

Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M, Mori K, Watanabe K, Kawamura K, Tsurufuji S, Ogawa M 1996, 'Kupffer cell production of cytokine-induced

neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury of rat liver', *Hepatology*, 26,1193-98.

Hordnes C , Tyssebotn I 1985, 'Effect of high ambient pressure and oxygen tension on organ blood flow in conscious trained rats', *Undersea Biomed Res*, 12,115-8.

Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J 1996, 'Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide', *Biochem Biophys Res Commun*, 222,27-32.

Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Berney DL, Sawaya DE, Olinde JG, Granger DN McDonald JC 2000, 'Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions', *Transplantation*, 69,300-14.

Huang PL 2003, 'Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction', *Curr Hypertens Rep*, 5(6),473-80.

Huguet C, Nordlinger B, Galopin JJ, Bloch P, Gallot D 1978, 'Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy', *Surg Gynecol Obst*, 147,689-93.

Hurata K, Imamura H, Brault A, Huet PM 1997, 'Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation', *Hepatology*, 25,664-71.

Ikonomidis JS, Weisel RD, Mickle DA 1994, 'Ischemic preconditioning: cardioprotection for cardiac surgery', *J Card Surg*, 9(3),526-531.

Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H 1992, 'Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat', *Br J Surg*, 79(4),310-

Jaeschke H 1997, 'Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases', *Am J Physiol*, 273:G602-11.

Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, Heaton ND, Rela M 2006, 'Ischemic Preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation', *Transplantation*, 81(2),169-74.

Kaelin CM, Im MJ, Myers RAM, Manson PN, Hoopes JE 1990, 'The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats', *Arch Surg*, 125:607-9.

Kalayoglu M, Stratta R, Hoffmann RM, Sollinger HW, D'Alessandro AM, Pirsch JD, Belzer FO 1988, 'Extended preservation of the liver for clinical transplantation', *Lancet*,617-9.

Kim, CH, Choi H, Chun YS, Kim GT 2001, 'Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium', *Pflungers Arch*, 442(4):519-25.

Kindwall EP. Management of complications in hyperbaric treatment. In Kindwall EP, Whelan HT, editors. *Hyperbaric medicine practice*. 2nd ed. Flagstaff, Best Publishing Company. 1999. P. 365-76.

Kihara K, Ueno S, Skoda M, Aikou T 2005, 'Effects of hyperbaric oxygen exposure on experimental hepatic ischemia reperfusion injury: relationship between its timing and neutrophil sequestration', *Liver Transplantation*, 11(12),1574-80.

Kobayashi S, Clemens MG 1992, 'Kupffer cell exacerbation of hepatocyte hypoxia/reoxygenation injury', *Circ Shock*, 37,245-52.

Kohli V , Madden JF, Bentley RC, Clavien PA 1999, 'Calpain mediates ischemic injury through modulation of apoptosis and necrosis', *Gastroenterology*, 116,168-78.

Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA 1999, 'Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver', *Transplantation*, 67:1099-105.

Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL, Texter J, Grigoriev VE, Zamboni WA 1998, 'Effect if hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury', *J Urol*, 160:601-3.

Kume M, Yamamoto Y, Sad S 1996, 'Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shockprotein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury', *J Lab Clin Med*, 128,251-8.

Kurir TT, Makoti A, Katalini V 2004, 'Effect of hyperbaric oxygenation on the regeneration of the liver after partial hepatectomy in rats', *Braz J Med Biol Res*, 37,1231-7.

Kyriakides C, Austen W Jr, Wang Y Favuzza J, Kobzik L, Moore FD Jr 1999, 'Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex', *Am J Physiol*, 277,C1263-8.

La Van FB, Hunt TK 1990, 'Oxygen and wound healing', *Clinics Plastic Surg*, 17(3),463-72.

Lahat N, Bitterman H, Yaniv N, Kinarty A, Bitterman N 1995, 'Exposure to hyperbaric oxygen induces tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages', *Clin Exp Immunol*, 102(3),655-9.

Launois B, Jamieson GG 1992, 'The importance of Glisson's capsule and its sheaths in the intrahepatic approach to resection of the liver', *Surg Gyn Obst*, 174,7-10.

Leach RM, Rees PJ, Wilmshurst P 1998, 'ABC of oxygen hyperbaric oxygen therapy', *BMJ*, 317,1140-3.

Lentsch AB, Yoshidone H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ 1998, 'Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells', *Hepatology*, 27,1172-7.

Liu W, Zhao W, Lu X, Zheng X, Luo C 2002, 'Clinical pathological study of treatment of chronic hepatitis with hyperbaric oxygenation', *Chin Med J*, 115 ,1153-7.

Liu Z, Xu Z, Shem W, Li Y, Zhang J, Ye X 2004, 'Effect of pharmacologic preconditioning with tetrandrine on subsequent ischemia/reperfusion injury in rat liver', *World J Surg*, 28(6),620-4.

Lloris-Carsí JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S 1993, 'Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia', *Transplant Proc*, 25(6),3303-4.

Makuuchi M, Moim T, Guven P, Yamazaki S, Hasegawa H 1987, 'Safety of hemi-hepatic vascular occlusion during resection of the liver', *Surg Gynecol Obstet*, 164(2),155-8.

Marcondes, CM, Lima EB 2000, 'A oxigenoterapia hiperbárica como tratamento complementar das úlceras de membros inferiores – parte 1', *Angiol Cir Vasc*, 12(2),54-60.

Marubayashi S, Oshiro Y, Maeda T, Fukuma K, Okada K, Hinoi T, Ikeda M, Yamada K, Itoh H, Dohi K 1997, 'Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury', *Surgery*, 122(1),45-52.

Mazariegos GV, O'Took K, Mielos LA, Dvorchila I, Meza MP 1999, 'Hyperbaric oxygen therapy for hepatic artery thrombosis after liver transplantation in children', *Liver Transpl Surg*, 5,429-36.

Michalopoulos GK, DeFrances MC 1997, 'Liver regeneration', *Science*, 276,60-6.

Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB 2004, 'As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão', *Acta Cir Bras*, 19(1),3-12.

Nakano H, Nagaski H, Barama A, Boudjema K, Jaeck D, Kumada K, Tatsuno M, Baek Y, Kitamura N, Suzuki T, Yamaguchi M 1997, 'The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet', *Hepatology*, 26(3),670-8.

Nagamine K, Kubota T, Togo S, Nagashima Y, Mori M, Shimada H 2004, 'Beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy on liver regeneration after 90% hepatectomy in rats', *Eur Surg Res*, 36(6),350-6.

Nagendra AR, Mickelson JK, Smith CW 1997, 'CD18 integrin and CD54-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated human hepatocytes', *Am J Physiol*, 272,G408-16.

Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y 1999, 'Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers', *Surgery*, 126,945-54.

Nazyrov FG, Akilov KA, Ibadov RA, Asabaer ASH, Zainutdinov UI, Khafizov BB 2002, 'Some pathogenetic aspects of developing liver failure and preventing it in patients with liver cirrhosis after portosystemic shunting', *Vestn Khir Im II Grek*, 161, 87-90.

Niinikoski JK 2004, 'Clinical hyperbaric oxygen therapy, wound perfusion, and transcutaneous oximetry', *World J Surg*, 28(3),307-11.

Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, Durak H, Issever H, Ipek T 2004, 'The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats', *Tohoku J Exp Med*, 203,253-65.

Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Rorrest CR 1995, 'Acute ischemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig', *Cardiovasc Res*, 29,782-8.

Paull DE, Keagy BA, Kron EJ, Wilcox BR 1989, 'Reperfusion injury in the lung preserved for 24 hours', *Ann Thorac Surg*, 47(2),187-92.

Parks DA, Granger DN 1986, 'Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation', *Am J Physiol*, 250,G749-53.

Peralta C, Closa D, Holtter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J 1996, 'Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin', *Biochem Biophys Res Commun*, 229,264-70.

Peralta C, Hotter G, Closa D, Bulbena O, Roselló Catafau J 1997, 'Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion: role of nitric oxide and adenosine', *Hepatology*, 25,934-7.

Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Roselló Catafau J 1999, 'The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors', *Hepatology*, 29,126-32.

Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpi E 2001, 'Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat', *Hepatology*, 34(6),1164-73.

Ping L, Wang C, Chen DD, Yao Z, Tian Y, Zhang J, Wu Y 2005, 'Gender differences in hepatic ischemic reperfusion injury in rats are associated with endothelial oxide synthase-derived nitric oxide', *World J Gastroenterol*, 11(22),3441-5.

Ponikvar R, Buturovic J, Cizman M, Mekjavic I, Kandus A, Premru V 1998, 'Hyperbaric oxygenation, plasma exchange and hemodialysis for treatment of acute liver failure in a 3-years-old child', *Artif Organs*, 22,952-7.

Pringle JH 1908, 'Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma', *Ann Surg*, 48,541-9.

Quireze CJr . Efeito do pré-condicionamento esquêmica nas fases precoce e intermediária da lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos. São Paulo, 2002. Tese- Doutorado – Escola Paulista de Medicina .Universidade Federal de São Paulo

Ratyck RE, Bulkley GB, Williams GM 1986, 'Ischemia/reperfusion injury in the kidney', *Prog Clin Biol Res*, 224,263-89.

Reichling JJ, Kaplan MM 1988, 'Clinical use of serum enzymes in liver disease', *Dig Dis Sci*, 33(12),1601-14.

Rezende-Neto JB. Resposta inflamatória sistêmica à síndrome de compartimento abdominal, isolada ou associada ao choque hemorrágico: estudo experimental em ratos, 2003. Tese – Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Riseman JA, Zamboni WA, Curtis A, Graham DR, Konrad HR, Ross DS 1990, 'Hiperbaric oxygen therapy for necrotizing fasciites reduces mortality and the need for debridements', *Surgery*, 108,847-50.

Rockey DC, Chung JJ 1995, 'Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility', *J Clin Invest*, 95,1199-206.

Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM 1998, 'Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39,777-85.

Rosario, RCV. Estudo sobre os efeitos da oxigenterapia hiperbárica em ratos com e sem ligadura das veias hepáticas: avaliação da mortalidade e histologia hepatoesplênica, 2004- Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Ross H, Marshall VC, Escott ML 1976, '72-hr canine kidney preservation without continuous perfusion', *Transplantation*, 21,498-501.

Rudiger HA, Clavien PA 2002, 'Tumor necrosis factor-alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver', *Gastroenterology*, 122,202-10.

Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA 2002, 'Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver', *Ann Surg*, 235,400-7.

Sakurai M, Hayashi R, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K 1998, 'Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits' *J Vasc Surg*, 27,720-5.

Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, Orita K 1996, 'Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia', *Transplant Proc*, 28,1908-9.

Schaper J, Schaper W 1983, 'Reperfusion of ischemic myocardium: ultra-structural and histochemical aspects', *J Am Coll Cardiol*, 1(4),1037-46.

Sessa WC, Harrison JK, Luthin O, Pollock JS, Linch KR 1993, 'Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase', *Hypertension*, 21(6 Pt 2),934-8.

Sherlock S, Dooley J. Assessment of liver function. In: Sherlock S, Dooley J – Diseases of the liver and biliary system 10^a ed., London, Black Well Scientific Publications, 1997. p 17-32.

Shigeki A, Masayuki I 2000, 'Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury', *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 7,40-8.

Shimamura Y, Guven P, Takenaka Y, Shimizu H, Akimoto H, Shima Y, Arima K, Takahashi A, Kitaya T, Matsuyanma T, Hasegawa H 1986, 'Selective portal branch occlusion by balloon catheter during liver resection', *Surgery*, 100,938-41.

Sterling DL, Thornton, JD, Swafford A, Gottlieb SF, Bishop SP, Stanley AW, Downey JM 1993, 'Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium *in vivo*', *Circulation*, 88,1931-6.

Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C 2000, 'Interleukin 6 and liver regeneration', *Gut*, 47,309-12.

Takayama R, Auerswald A, Schafers HJ, Dammenhayn L, Haverich A 1987, 'The protective effect of superoxide dismutase during reperfusion of the ischemic lung', *Transplant Proc*, 19,1332-3.

Thom SR, Taber RL, Mendiglyren II, Clark JM, Hardy KR, Fisher AB 1995, 'Delayed neuropsychological sequelae following carbon monoxide poisoning and its prophylaxis by treatment with hyperbaric oxygen', *Ann Emerg Med*, 25,474-80.

Thorsen E, Segadal K, Reed JW, Elliott C, Gulsvik A, Hjelle JO 1995, 'Contribution of hyperoxia to reduced pulmonary function after deep saturation dives', *J Appl Physiol*, 78,1421-4.

Thorsen E, Aanderud L, Aasen TB 1998, 'Effects of a standard hyperbaric oxygen treatment protocol on pulmonary function', *Eur Respir J*, 12,1442-5.

Turman MA, Bater CM 1977, 'Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells', *Ren Fail*, 19,47-60.

Uematsu D, Greenberg JH, Reivich M, Hickey WF 1989, 'Direct evidence for calcium-induced ischemic and reperfusion injury', *Ann Neurol*, 26(2),280-3.

Upadhyaya GA, Strasberg SM 2002, 'Platelet adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation', *Transplantation*, 73,1764-70.

Upadhyaya GA, Topp Sa, Hotchkiss RS, Anagli J, Strasger SM 2003, 'Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells', *Hepatology*, 37(2),313-23.

Upton PG, Yamaguschi KT, Myers S, Kidwell TP, Anderson RJ 1986, 'Effects of antioxidants and hyperbaric oxygen in ameliorating experimental doxorubicin skin toxicity in the rat', *Cancer Treat Rep*, 70(4),503-7.

Uwagawa T, Unemue Y, Yamazaky Y 2001, 'Hyperbaric oxygenation after portal vein embolization for regeneration of the predict remnant liver', *J Surg Res*, 100,63-8.

Wada K, Miiyazawa T, Nomura N, Tsuzudi N, Nawshiro H, Shima K 2001, 'Preferential conditions for and possible mechanisms of induction of ischemic tolerance by repeated hyperbaric oxygenation in gerbil hippocampus', *Neurosurg*, 49(1):160-6.

Weiser MR, Williams JP, Moore FD Jr, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB 1996, 'Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement', *J Exp Med*, 183,2343-8.

Williams JP, Pechet TT, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore FD Jr 1999, 'Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement', *J Appl Physiol*, 86,938-42.

Woods HF, Krebs HA 1971, 'Lactate production in the perfused rat liver', *Biochem J*, 125,129-39.

Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA 1999, 'P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver', *Hepatology*, 29(5),1494-502.

Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA 2002, 'Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspatase-dependent pathway', *Hepatology*, 36,A28.

Yamada T, Taguchi T, Hirat Y, Suita S, Yagi H 1995, 'The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemia-reperfusion injury', *J Pediatr Surg*, 6,786-90.

Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Yu HY, Hsieh CC, Chen PJ, Lui WY, Wu CW 2005, 'Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia/reperfusion injury in rats', *J Surg Res*, 128,28-36.

Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Smoot EC 1992, 'Effect of hyperbaric oxygen on reperfusion of ischemic axial skin flaps: a laser doppler analysis', *Ann Plast Surg*, 28(4),339-41.

Zamboni WA, Wong HP, Stephenson LL 1996, 'Effect of hyperbaric oxygen on neutrophil concentration and pulmonary sequestration in reperfusion injury', *Arch Surg*, 131(7),756-60.

10 Anexos

Anexo 1

Valores de aspartato-aminotransferase (AST), alanino-aminotransferase (ALT) e desidrogenase láctica (DHL) do sangue em UI/L

GRUPOS	EXAMES								
	AST P	AST I30	AST R30	ALT P	ALT I30	ALT R30	DHL P	DHL I30	DHL R30
A	79,1 ± 32,4	62,8 ± 22,3	69,2 ± 31,6	43,1 ± 13,5	40,7 ± 11,5	39,7 ± 11,6	283,0 ± 74,7	268,4 ± 60,5	244,6 ± 66,6
B	57,5 ± 23,5	72,6 ± 23,4	149,3 ± 53,3	39,6 ± 15,7	48,1 ± 12,2	145,9 ± 71,1	200,8 ± 97,0	286,3 ± 102,1	833,4 ± 458,0
C	72,0 ± 22,3	78,7 ± 28,7	262,0 ± 136,2	50,6 ± 15,6	51,6 ± 12,5	321,6 ± 181,1	200,9 ± 88,9	320,6 ± 75,0	1911,0 ± 1409,0
D	63,9 ± 16,3	98,0 ± 27,8	179,9 ± 97,9	31,4 ± 6,2	43,2 ± 11,9	163,0 ± 71,2	240,6 ± 102,3	301,6 ± 106,5	1043,0 ± 575,7

Antes da isquemia (P), após 30 minutos de isquemia (I30) e após 30 minutos de reperfusão (R30), nos animais dos grupos A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático (n=8); B - isquemia/reperfusão hepática (n=8); C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática (n=8) e D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática (n=8).

Anexo 2

Número relativo de neutrófilos ($\times 10^5$) por miligrama de tecido após 30 minutos de reperfusão do fígado (n = 8 animais/grupo)

Órgão	Grupos			
	A	B	C	D
Fígado	0,79 ± 0,37	0,94 ± 0,39	1,67 ± 0,40	0,76 ± 0,67
Pulmão	5,18 ± 1,64	13,56 ± 4,22	24,79 ± 1,66	26,20 ± 0,83

Grupos: A - laparotomia e manipulação do pedículo hepático, B - isquemia/reperfusão hepática; C - pré-condicionamento em oxigenoterapia hiperbárica e isquemia/reperfusão hepática e D - pré-condicionamento em ar ambiente hiperbárico e isquemia/reperfusão hepática.

Os valores representam a média ± DP

