

Efeito da anestesia com propofol na bioenergética mitocondrial e stresse oxidativo no fígado de rato

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biologia Clínica Laboratorial

Pedro Alexandre Alves Pinto



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
VILA REAL, 2011

Júri de apreciação

Presidente: _____

1º Vogal: _____

2º Vogal: _____

Classificação: _____

Data: ____/____/____

Orientador

Professor Doutor Francisco Peixoto

Co-orientador

MD Fernando Correia

Agradecimentos

Ao Professor Francisco Peixoto, meu orientador científico, pela disponibilidade e toda a sabedoria fornecida, bem como pelo incentivo constante, boa disposição e sentido de humor que sempre demonstrou. Agradeço-lhe também pela leitura cuidadosa, com espírito crítico do texto, assim como as sugestões emitidas.

Ao Dr. Fernando Correia, meu co-orientador científico, por ter aceite que faça parte deste projeto, bem como pela disponibilidade que sempre revelou para esclarecer as minhas dúvidas, pelo apoio e amizade demonstrados.

Ao Professor Luís Antunes, por me ter sugerido este tema de trabalho, pelo espírito crítico e todos os meios que sempre disponibilizou para a boa realização deste projeto.

Ao Professor Romeu Videira pelos seus sábios conselhos e pela ajuda que sempre prestou na resolução de todos os problemas que foram surgindo.

À Professora Maria Manuela Oliveira, pela disponibilidade que sempre revelou para esclarecer as minhas dúvidas, bem como a amizade demonstrada.

Ao Luís Félix, pela disponibilidade e ajuda preciosa na realização de todos os trabalhos laboratoriais e escrita do manuscrito, bem como o companheirismo e amizade que sempre demonstrou.

À minha colega de trabalho, Telma, pela preciosa colaboração prestada ao longo deste trabalho e amizade.

Aos meus familiares, principalmente aos meus pais, ao meu irmão e ao meu avô que sempre me encorajaram e apoiaram mesmo nos momentos mais difíceis.

À Filipa pela constante ajuda, amizade, carinho e paciência que teve ao longo da realização deste trabalho.

A todos os amigos que sempre estiveram presentes aconselhando-me e incentivando com carinho e dedicação.

A todos um muito obrigado!

Resumo

Objetivos: O propofol (2,6-diisopropilfenol) é um potente anestésico intravenoso (i.v.) que é predominantemente metabolizado no fígado, podendo causar hepatotoxicidade afetando a bioenergética mitocondrial. Contudo, os mecanismos moleculares pelo qual o propofol induz hepatotoxicidade não foram totalmente elucidados. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da anestesia com propofol utilizando duas doses clínicas (25 e 62,5 mg/kg/h) ao nível da bioenergética mitocondrial e ao nível das enzimas hepáticas relacionadas com biomarcadores do stresse oxidativo, comparando com um grupo controlo.

Principais métodos: Isolamento de mitocôndrias hepáticas de cada tratamento, sendo posteriormente avaliados os parâmetros respiratórios pelo consumo de oxigénio, assim como, o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) mitocondrial, acumulação de Ca^{2+} extramitocondrial, atividade dos complexos mitocondriais e atividades antioxidantes enzimáticas (CAT SOD, GR, GST). Biomarcadores do stresse oxidativo também foram avaliados (GSH/GSSG e LPO).

Principais resultados: O potencial de membrana mitocondrial diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de propofol. As mitocôndrias da dose mais alta de propofol apresentaram uma menor capacidade em acumular cálcio. Não se observaram diferenças na razão GSH/GSSG entre o controlo e os dois tratamentos.

Conclusão: Os resultados deste estudo apoiam a hipótese de que a anestesia com propofol induz uma sobrecarga de cálcio e uma lesão hepática através de um mecanismo dependente da transição de permeabilidade mitocondrial (MPT).

Palavras-chave: Propofol; Anestesia; Mitocôndrias de fígado de rato; Bioenergética; Stresse oxidativo.

Abstract

Aims: Propofol (2,6-diisopropylphenol) is a potent intravenous (i.v.) anaesthetic which is predominately hepatically metabolized. However it can cause hepatotoxicity by affecting mitochondrial bioenergetics. So far, the molecular mechanisms for propofol-induced hepatotoxicity have not been fully elucidated. The aim of the present work was to investigate the action of propofol anaesthesia with two clinical doses (25 and 62.5 mg/kg/h) in mitochondrial rat liver and also evaluate the effect of propofol in liver enzymes related to oxidative stress biomarkers and compare with control animals.

Main methods: Liver mitochondria for each treatment were isolated and respiratory parameters evaluated by oxygen consumption, as well measured mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$), extramitochondrial free Ca^{2+} , mitochondrial enzyme activities and enzymatic antioxidant activities (SOD, CAT, GR, GST). Oxidative stress biomarkers were also evaluated (GSH/GSSG and LPO).

Key findings: Mitochondrial transmembrane electric potential was decreased by propofol in a concentration dependent manner. The mitochondria treated with the highest propofol show a lower capacity to accumulate calcium. No difference was observed in the evaluation of GSH/GSSG ratio between the two treatments and control.

Significance: The results of this study support the hypothesis that propofol anaesthesia induces calcium overload and liver injury via a mechanism dependent on mitochondrial permeability transition (MPT).

Keywords: Propofol; Anaesthesia; Rat liver mitochondria; Bioenergetics; Oxidative stress.

Índice Geral

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract.....	VI
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas	X
Abreviaturas.....	XI

I - Revisão Bibliográfica

1. Revisão bibliográfica.....	2
1.1 Anestesia	2
1.2 Propofol.....	3
1.2.1 Características físico-químicas	3
1.2.2 Mecanismo de ação.....	4
1.2.3 Propriedades Farmacocinéticas.....	5
1.2.4 Mecanismos de metabolização e eliminação	5
1.2.5 Efeitos colaterais.....	7
1.3 Tecido hepático	8
1.4 Mitocôndria – Alvo farmacológico	9
1.5 Propriedades Antioxidantes do Propofol.....	12
1.6 Enzimas antioxidantes na defesa contra ROS	13
1.7 Estudos prévios	14

II - Objetivo

2. Objetivo.....	18
------------------	----

III – Trabalho Experimental

3.1 Abstract	20
3.2 Introduction	21
3.3 Materials and methods	23
3.3.1 Chemicals.....	23
3.3.2 Experimental design	23
3.3.3 Isolation of liver mitochondrial	24
3.3.4 Evaluation of liver mitochondrial function.....	24
3.3.5 Mitochondrial Ca^{2+} -induced calcium release.....	25

3.3.6	Mitochondrial enzyme activities.....	25
3.3.7	Enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities	26
3.3.8	Statistical analysis	28
3.4	Results	29
3.4.1	Mitochondrial respiration	29
3.4.2	Mitochondrial transmembrane potential	30
3.4.3	Mitochondrial Ca^{2+} -induced calcium release.....	31
3.4.4	Mitochondrial enzymatic activities.....	32
3.4.5	Enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities	33
3.5	Discussion	35
3.6	Conclusion.....	40
IV - Conclusão		
4.	Conclusão	42
V - Bibliografia		
5.	Bibliografia.....	45

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do propofol.	3
Figura 2. Representação esquemática da biotransformação do propofol no homem.	6
Figura 3. Efeito das drogas na mitocôndria.....	11
Figure 4. Effects of different doses of propofol anaesthesia in rat liver mitochondrial transmembrane potential.....	31
Figure 5. Effects of different doses of propofol anaesthesia in rat liver Ca^{2+} -induced calcium release.	32

Índice de Tabelas

Table 1. Effects of different doses of propofol anaesthesia on the respiration of isolated mitochondria of rat liver. 30

Table 2. Effects of different doses of propofol anaesthesia on the activity of mitochondrial complexes in rat liver. 32

Table 3. Effects of different doses of propofol anaesthesia on antioxidant enzymes and oxidative stress biomarkers in rat liver homogenates..... 33

Abreviaturas

ADP	Adenosina Difosfato
ALF	Insuficiência hepática aguda
ATP	Adenosina Trifosfato
BHA	Mistura de dois isómeros, o 2 e o 3- <i>terc</i> -butil4-hidroxianiso
BHT	2,6-bis ₂ (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
BSA	Albumina do Soro Bovino
CAT	Catalase
CYP	Citocromo P-450
DNA	Ácido dextrorribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diaminatetracético
EGTA	Ácido bis-etilenoglicol tetracético
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido (forma reduzida)
GABA	Ácido <i>gamma</i> -aminobutírico
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa (forma reduzida)
GSSG	Glutationa (forma oxidada)
GST	Glutationa S-transferase
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
i.v.	Intravenosa
LPO	Peroxidação Lipídica
MPT	Transição de permeabilidade mitocondrial
MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido Fosfato (forma reduzida)
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PRIS	Síndrome de infusão prolongada de propofol
RCR	Índice de Controlo Respiratório
RFU	Unidades arbitrárias de Fluorescência
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TPP⁺	Catão Tetrafenilfosfónio
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana

I - Revisão Bibliográfica

1. Revisão bibliográfica

1.1 Anestesia

Ao longo da história da anestesia, a segurança do doente foi sempre uma prioridade. Quando o indivíduo está sob o efeito de anestesia, diversos fatores representam uma ameaça à homeostase, tal como, distúrbios hemodinâmicos e bioquímicos, inflamação associada à cirurgia, agentes infecciosos e dor.

No início dos anos 80, os fármacos utilizados durante a anestesia intravenosa (i.v.) eram associados a efeitos secundários frequentes (náuseas, vômitos, tonturas, sedação residual e fadiga) e a um tempo de recuperação muito prolongado (White, 2008). Por esta razão, nos últimos anos, tem sido observado um desenvolvimento significativo que levou ao aparecimento de novos fármacos e novas técnicas que permitiram diminuir significativamente estes efeitos secundários. Sendo que esta evolução está diretamente relacionada com o desenvolvimento dos anestésicos da nova geração, como é o caso dos anestésicos intravenosos, que apresentam um início de ação rápida e um tempo de semivida breve, sendo o propofol um bom exemplo.

Após a sua aprovação pela “Food and Drug Administration”, em 1986, o propofol tornou-se rapidamente, num dos anestésicos preferenciais para a indução do coma anestésico (White, 2008). Este último, mesmo quando comparado com um anestésico volátil (sevoflurano), mostrou resultados muito positivos: menor incidência de náuseas e vômitos pós-operatórios, maior satisfação do paciente e menor relação custo/eficácia (Tang et al., 1999).

A escolha do propofol como anestésico geral para este estudo deve-se ao facto de ao longo dos últimos 20 anos, ter-se tornado no fármaco de eleição para anestesia i.v. na prática clínica. Para além de um anestésico de indução e manutenção da anestesia geral, o uso do propofol já passou as barreiras do bloco operatório, sendo usado em unidades de cuidados intensivos (Fagerlund et al., 2010; Fodale e La Monaca, 2008; Marik, 2004; Mirenda e Broyles, 1995), na emergência e em unidades de exames complementares de diagnóstico, em que é necessária a sedação do doente. Além das múltiplas vantagens como anestésico, o propofol tem múltiplos efeitos não anestésicos, possuindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatório e broncodilatadoras (Fodale e La Monaca, 2008; Marik, 2004).

Apesar de ter havido uma evolução significativa nas técnicas de anestesia, ao longo dos últimos anos, continuam a ocorrer mortes durante a anestesia, sendo por

vezes a causa desta desconhecida. Na investigação destas causas têm sido usados uma grande variedade de animais, tais como o cão, o gato, o coelho (Brodbelt, 2009) e o porco (Murayama et al., 2005). No entanto, a nossa escolha recaiu sobre o rato, por este modelo ser o mais utilizado em estudos de bioenergética mitocondrial no fígado (Branca et al., 1991a; Branca et al., 1991b; Rigoulet et al., 1996; Stevanato et al., 2001).

Embora haja uma grande variedade de estudos com propofol, neste momento, são raros os estudos que avaliam os efeitos na bioenergética mitocondrial *in vivo*. Porém, *in vitro* existem estudos que demonstram uma ação do propofol na bioenergética mitocondrial hepática (Acco et al., 2004).

1.2 Propofol

1.2.1 Características físico-químicas

O propofol é um alquiifenol (2,6-diisopropilfenol) (Figura 1), é considerada uma droga hipnótica (Ypsilantis et al., 2006), diferindo quimicamente de todos os outros anestésicos intravenosos (Baker e Naguib, 2005).

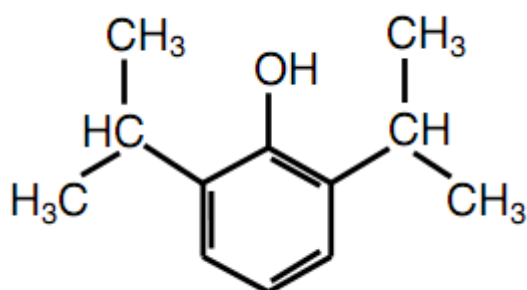


Figura 1. Estrutura química do propofol. Fonte: (Kotani et al., 2008).

Devido às suas características altamente lipofílicas, o propofol é apenas miscível em solventes orgânicos ou substâncias lipofílicas, tendo sido por isso difícil desenvolver um veículo biocompatível que assegurasse um perfil farmacodinâmico adequado e simultaneamente apresentasse efeitos colaterais mínimos (Baker e Naguib, 2005).

O propofol é comercializado numa solução oleosa à temperatura ambiente e insolúvel em solução aquosa (Marik, 2004). As soluções consistem em 1 % ou 2 %

(p/v) de propofol, 10 % de óleo de soja, 2,25 % de glicerol e 1,2 % de fosfolípidos purificados de ovo (Marik, 2004; Mirenda e Broyles, 1995). Uma vez que o veículo pode estar sujeito ao crescimento bacteriano, é necessário manter condições de asséptica, sendo por isso, adicionado EDTA para retardar o crescimento de fungos e bactérias (Baker e Naguib, 2005; Kotani et al., 2008; Marik, 2004).

1.2.2 Mecanismo de ação

O mecanismo exato de ação dos anestésicos gerais não está totalmente esclarecido, no entanto, é sabido que os anestésicos possuem como alvo de ação diferentes recetores e estruturas neuronais, com o objetivo de provocar imobilidade, inconsciência e amnésia (Franks, 2008).

O principal mecanismo de ação conhecido do propofol parece ser mediado através da inibição gabaérgica neuronal, através da ativação direta do recetor pós-sináptico GABA_A (Gama Amino Acid Butyric – A) (Franks, 2008; Tanelian et al., 1993). O propofol interage com o complexo ionóforo do recetor GABA, aumentando a condutância do ião cloreto e levando à hiperpolarização neuronal (Franks, 2008). Há quem defenda que a ativação dos recetores centrais de GABA_B pode, pelo menos, contribuir parcialmente para a ativação das propriedades anestésicas do propofol (Schwieler et al., 2003).

Yamakura et al. (1999) defendem que o propofol também poderá atuar ao nível dos recetores de glutamato, causando a inibição do subgrupo NMDA (*N*-metil-D-aspartato). Este também inibe os canais de sódio (Na⁺) dependentes de voltagem e modula o influxo de cálcio (Ca²⁺) através dos canais lentos de Ca²⁺ (Kotani et al., 2008).

Fodale e Monaca (2008) defendem que o propofol tem uma ação neuroprotectora, através da inativação dos recetores GABA e dos neurotransmissores excitatórios, que têm um papel importante na morte neuronal induzida por isquémia no cérebro.

1.2.3 Propriedades Farmacocinéticas

O propofol adquiriu a sua popularidade por ser um anestésico geral i.v. de curta duração (Raoof et al., 1996; Rison e Ko, 2009; Sztark et al., 1995) devido às suas características farmacocinéticas que lhe permitem um início de ação rápida (Fodale e La Monaca, 2008; Marik, 2004; Rison e Ko, 2009) e uma rápida eliminação do organismo. Apresentando assim um tempo de recuperação pós-operatória menos moroso, mesmo após o uso prolongado (Fodale e La Monaca, 2008; Marik, 2004). O crescente conhecimento sobre as propriedades farmacocinéticas do propofol, ao longo das últimas décadas, permitiu a obtenção de informação suficiente para melhorar o uso deste em ensaios clínicos (Sneyd, 2004).

O perfil farmacocinético do propofol é, regra geral, descrito como sendo a soma de duas ou três funções exponenciais: rápida passagem do sangue para os tecidos, rápida remoção metabólica e um retorno lento à circulação sanguínea a partir de um tecido mal irrigado (McNeir et al., 1988).

O propofol é uma molécula altamente lipofílica (Rison e Ko, 2009), podendo difundir-se rapidamente do sangue para os órgãos e tecidos (Glowaski e Wetmore, 1999). Segundo Bienert et al. (2009), a farmacocinética e a distribuição do propofol é dependente do débito cardíaco. Kuipers et al. (1999) defendem que alterações no débito cardíaco podem influenciar a concentração de propofol no fluxo sanguíneo do fígado, influenciando desta forma a sua eliminação.

1.2.4 Mecanismos de metabolização e eliminação

O propofol deve o seu sucesso clínico ao seu perfil único de ação, redistribuição, metabolização e eliminação rápida (Kotani et al., 2008). Sendo predominantemente metabolizado no fígado (Larijani et al., 1989; Rison e Ko, 2009). No entanto, a contribuição de alguns tecidos extra hepáticos têm um papel importante (Acco et al., 2004). Com base em estudos realizados para a avaliação da metabolização do propofol ao nível hepático, concluiu-se que este não seria exclusivamente metabolizado no fígado, pois o aporte hepático do propofol pelo sangue é inferior ao propofol eliminado num determinado período de tempo (Kuipers et al., 1999). Desta forma concluiu-se que teriam que existir outros locais de metabolização deste fármaco, sendo os rins, intestinos (Acco et al., 2004) e pulmões (Murayama et al., 2005)

indicados como potenciais locais. Murayama et al., (2005) demonstraram a importância do metabolismo extra-hepático do propofol, através da quantificação do propofol durante um transplante de fígado em porcos anões, tendo sido concluindo que a concentração não aumenta durante o período em que o fígado foi retirado.

No ser humano, o propofol apenas é eliminado do corpo após ter sido metabolizado, sendo a maioria excretado pelos rins como metabolitos inativos (Guitton et al., 1998). A conjugação do propofol ao ácido glucurónico é considerada a principal reação de biotransformação (Raouf et al., 1996). Court et al., (2001) demonstraram a ocorrência da oxidação a 4-hidroxi-2,6-diisopropilfenol (4-hidroxipropofol), seguido da conjugação com o ácido glucurónico. A glucuronidação do propofol é catalizada pela UDP-glucuroniltransferase 1A9 (Sutherland et al., 1993), sendo as enzimas da família do citocromo P-450 (CYP), nomeadamente a isoenzima 2B6, responsáveis pela ocorrência de hidroxilação no anel benzeno para formar 4-hidroxipropofol (Court et al., 2001). Sendo posteriormente glucuronadas no carbono 1 (C₁) ou 4 (C₄), ou sulfonadas no C₄ (Figura 2) (Court et al., 2001; Guitton et al., 1998), originando metabolitos inativos, à exceção do 4-hidroxipropofol que apresenta 1/3 da atividade hipnótica do propofol (Court et al., 2001).

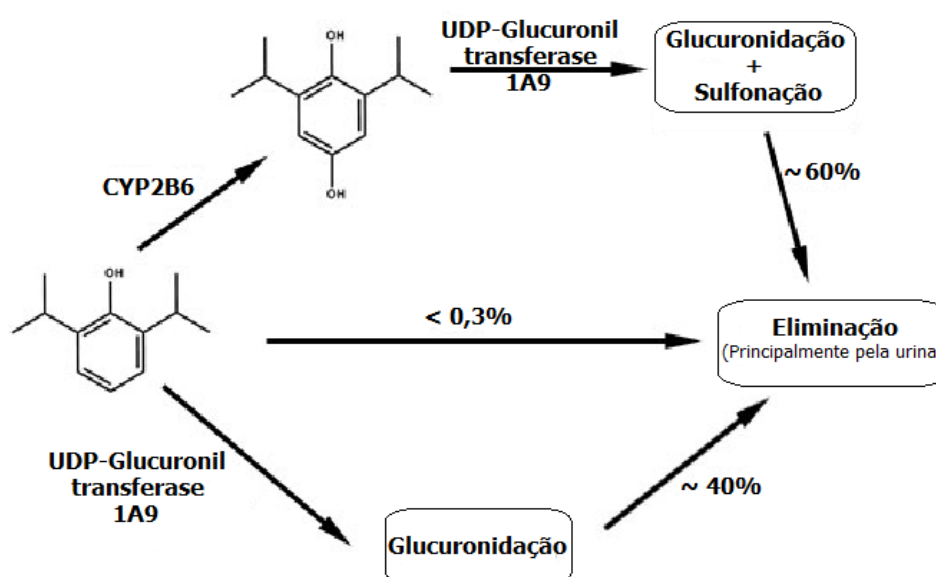


Figura 2. Representação esquemática da biotransformação do propofol no homem. Adaptado de Court et al., (2001).

Foi demonstrado que, nos microssomas do fígado humano, o CYP2B6 é a isoforma predominante envolvida na oxidação do propofol (Oda et al., 2001). Court et

al. (2001) defendem que o CYP2B6 é a causa principal da variabilidade interindividual observada na hidroxilação do propofol pelos microsomas do fígado no homem.

1.2.5 Efeitos colaterais

O propofol é considerado um anestésico seguro e eficiente em humanos, no entanto, existem algumas restrições quando é administrado prolongadamente (Fodale e La Monaca, 2008; Ypsilantis et al., 2006). Segundo Kotani et al. (2008), os efeitos colaterais mais comuns são; depressão respiratória, hipotensão, pancreatite e septicemia.

Em alguns casos de sedações prolongadas com propofol, mais de cinco dias em adultos e dois dias em crianças (Vasile et al., 2003), pode ocorrer uma complicação descrita como síndrome de infusão prolongada de propofol (PRIS), sendo a maioria das vezes fatal (Fodale e La Monaca, 2008; Nouette-Gaulain et al., 2007; Rison e Ko, 2009), no entanto, também existem relatos da ocorrência de PRIS em anestésias com um tempo de duração mais curto (Fodale e La Monaca, 2008). Este sintoma está associado, a insuficiência cardíaca grave, disritmias, acidose metabólica severa, insuficiência renal aguda e por vezes rabdomiólise (Fodale e La Monaca, 2008; Nouette-Gaulain et al., 2007; Rison e Ko, 2009). Segundo Fodale e La Monaca (2008), deficiências ao nível das mitocôndrias, toxicidade mitocondrial, oxidação tecidual e carência ao nível dos hidratos de carbono são alguns das causas prováveis para este acontecimento. A arritmia pode ser devido à acumulação extracelular de ácidos gordos, sendo que a alteração do metabolismo energético mitocondrial poderá contribuir para as falhas cardíacas e para a rabdomiólise, que por seu lado seria responsável pela acidose e pela insuficiência renal (Vasile et al., 2003). Não existe nenhum tratamento específico deste síndrome (Nouette-Gaulain et al., 2007). Sendo a prevenção deste a única solução, esta prevenção baseia-se na diminuição da quantidade de propofol administrado por unidade de tempo, e na identificação prévia de pacientes de risco, como os pacientes que possuem uma miopatia mitocondrial (Nouette-Gaulain et al., 2007), deficiência na oxigenação, sepsis e lesões cerebrais graves (Fodale e La Monaca, 2008).

1.3 Tecido hepático

O fígado tem o papel principal no controle da homeostase, tendo um papel primordial na metabolização das drogas, síntese de hormonas, síntese dos fatores de coagulação, armazenamento de glucose e formação da bÍlis. O fígado devido sua função será o Órgão mais suscetÍvel a lesões durante a metabolização do propofol (Murayama et al., 2005).

Nos países mais desenvolvidos, uma das principais causas de insuficiência hepática aguda (ALF) é induzida por drogas (Kneiseler et al., 2010). Segundo Zimmerman (2000), existe uma correlação entre a categoria farmacológica da droga e o tipo de lesões que esta causa. Sendo a hepatotoxicidade uma das principais causas para a retirada de um fármaco do mercado ou até a principal razão para a não comercialização de um determinado produto farmacológico em desenvolvimento pré-clínico (Kass, 2006).

Ao nível da hepatotoxicidade induzida por drogas, a morte celular é o acontecimento principal, levando posteriormente a várias manifestações clÍnicas (Kaplowitz, 2002). Geralmente a hepatotoxicidade é diretamente proporcional à dose de tÓxico administrado (Kass, 2006). As drogas podem causar ALF, originar a produção de metabolitos tÓxicos provocando uma reação imune ou atuando diretamente na sinalização celular ao nível dos hepatÓcitos (Kaplowitz, 2002). Nos seres humanos, as drogas podem induzir hepatotoxicidade crÓnicas ou agudas apresentando normalmente alterações histológicas (Kneiseler et al., 2010).

Certas drogas também inibem a função mitocondrial afetando negativamente a β -oxidação, provocando a acumulação de ácidos gordos livres dentro dos hepatÓcitos, levando à morte celular por insuficiência hepática (Kneiseler et al., 2010).

Foram já descritos alguns casos de ALF após anestesia com propofol, sendo exemplo disso, o caso de uma mulher caucasiana de 35 anos que foi internada com um diagnóstico de ALF. Esta, uma semana após ter sido sujeita a uma anestesia com propofol, apresentava valores de transaminases elevados, uma diminuição da coagulação, um aumento das enzimas hepáticas e ocorrência de icterícia avançada. A biopsia hepática realizada revelou a existência de uma hepatite crÓnica e persistente levando à morte celular, colestases hepatocelulares, com uma degeneração microvesicular de 90% do parênquima hepático (Kneiseler et al., 2010). Os resultados das análises foram consistentes com o diagnóstico inicial, que indicava toxicidade

provocada pela administração de propofol, pois a paciente não apresentava antecedentes ao nível de problemas hepáticos e consumo de álcool, não havendo nenhum familiar com problemas hepáticos (Kneiseler et al., 2010).

Também já foram reportadas algumas reações adversas em crianças, após infusões prolongadas com propofol, tendo a biopsia hepática revelado alterações necrosadas (Cray et al., 1998).

A hepatotoxicidade de uma droga é, regra geral, classificada intrínseca versus idiossincrática. A toxicidade intrínseca depende da dose que é usada e ocorre em indivíduos que são expostos a uma dose excessiva de um determinado medicamento. Este tipo de toxicidade é mais fácil de estudar, pois é reprodutível em modelos animais. Por outro lado, as reações idiossincráticas são imprevisíveis, sendo causadas pela incapacidade do indivíduo em tolerar um determinado composto ou devido às diferenças farmacogenéticas entre indivíduos, podendo ser imunológicas ou metabólicas (Zimmerman, 2000). As reações idiossincráticas são as razões mais frequentes para proceder à retirada de uma droga do mercado (Boelsterli e Lim, 2007; Kass, 2006).

Segundo Boelsterli e Lim (2007), as mitocôndrias possuem características funcionais e estruturais únicas, tornando-as um alvo crucial de certas drogas. Estas podem desempenhar um papel importante no mecanismo de ação de lesões hepáticas idiossincráticas induzidas por drogas.

Apesar de alguma informação existente, a complexidade do fígado leva a que seja difícil extrapolar os resultados *in vitro* para o contexto *in vivo*, sendo que a falta de modelos *in vitro* de hepatotoxicidade idiossincrática continua a ser um desafio para os cientistas (Kass, 2006).

1.4 Mitocôndria – Alvo farmacológico

É nas mitocôndrias onde ocorrem a maioria das reações do metabolismo energético, tais como o ciclo de Krebs, β -oxidação dos ácidos gordos, oxidações fosforilativas (Muravchick e Levy, 2006; Nouette-Gaulain et al., 2007; Pereira et al., 2009) e parte do ciclo da ureia e da neoglucogénese. Por essa razão as mitocôndrias têm um papel central nas células dos mamíferos (Nouette-Gaulain et al., 2007). Estas também exercem um papel importante no mecanismo da apoptose, formação de

radicais livres (Muravchick e Levy, 2006; Nouette-Gaulain et al., 2007; Szewczyk e Wojtczak, 2002) e regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} (Fernandes et al., 2006). As funções mitocondriais podem variar em funções do tipo de células em que se encontram. As mitocôndrias também estão envolvidas na produção de estrogénio e testosterona, síntese de hemoglobina e têm um papel importante no metabolismo do colesterol (Dyken e Will, 2007).

A atividade mitocondrial é regulada fisiologicamente por uma interação entre complexos heteropoliméricos (Dyken e Will, 2007; Nouette-Gaulain et al., 2007), Complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase); complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase); complexo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductase) e complexo IV (citocromo *c* oxidase) (Desai et al., 2000), localizados na membrana interna da mitocôndria. A cadeia respiratória é constituída por uma série de reações redox envolvendo a oxidação de nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleótido reduzida (FADH_2) à redução do oxigénio com formação de água (Nouette-Gaulain et al., 2007).

O fígado, o cérebro, o músculo cardíaco e o esquelético são os órgãos com a atividade metabólica mais elevada, contendo por isso um maior número de mitocôndrias por célula, pelo que são também os órgãos mais suscetíveis às drogas que atuam nas mitocôndrias (Szewczyk e Wojtczak, 2002).

O facto das mitocôndrias terem um papel central nos mecanismos de morte celular, e o seu envolvimento em doenças cardiovasculares, diabetes, o cancro (Pereira et al., 2009) e em doenças neurodegenerativas, como Parkinson ou Alzheimer (Boelsterli e Lim, 2007; Szewczyk e Wojtczak, 2002), fez com que o interesse científico relativamente à mitocôndria aumentasse consideravelmente (Pereira et al., 2009).

Como já foi referido, as mitocôndrias são um dos alvos preferenciais de certos agentes farmacológicos (Boelsterli e Lim, 2007; Dyken e Will, 2007; Szewczyk e Wojtczak, 2002), como é o exemplo dos imunossuppressores, antidiabéticos sulfonilureias, e alguns agentes antilipidêmicos, sendo por isso importante conhecer a interação de certos produtos terapêuticos nas mitocôndrias (Szewczyk e Wojtczak, 2002).

Alguns dos agentes farmacológicos como por exemplo os anestésicos locais podem interagir negativamente com o mecanismo mitocondrial (Nouette-Gaulain et al., 2007).

Ao nível da fisiopatologia, foi demonstrado que os anestésicos interagem com as diferentes estruturas das mitocôndrias, tendo um efeito protetor ou por vezes tóxico para a célula ou até para o próprio órgão, dependendo o efeito das propriedades físico-químicas das moléculas (Nouette-Gaulain et al., 2007).

Segundo Szewczyk e Wojtczak (2002), os medicamentos que interagem com as mitocôndrias podem ser divididos em dois grupos, os que têm como objetivo específico afetar as funções mitocondriais e os que têm outro alvo na célula, mas afetam as mitocôndrias por efeitos colaterais. Dykens e Will (2007) sugerem que a atividade mitocondrial pode ser inibida de diversas formas (Figura 3.), sendo o desacoplamento e a inibição do transporte de elétrões, exemplo disso.

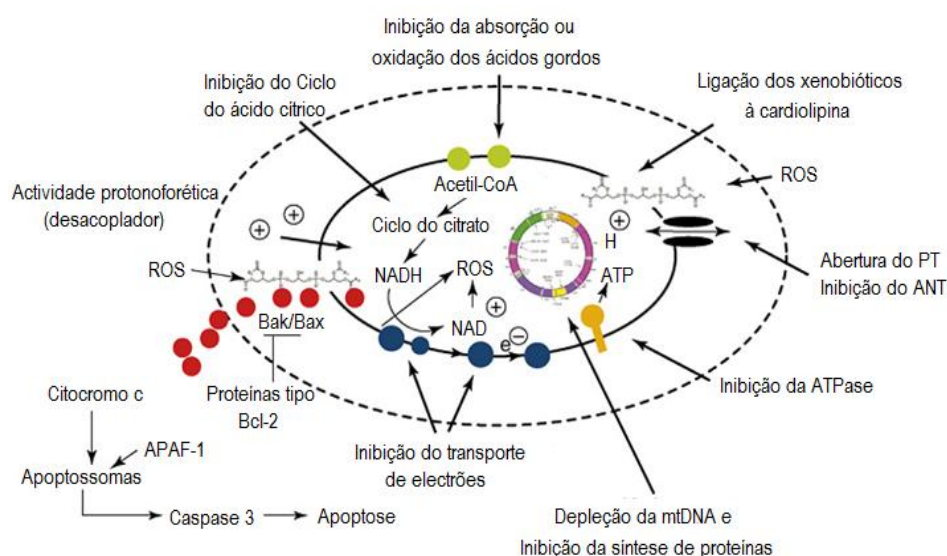


Figura 3. Efeito das drogas na mitocôndria. Adaptado de Dykens and Will, 2007.

Também pode haver um comprometimento na troca de substratos necessários através dos transportadores membranares, inibição de vias metabólicas importantes na respiração e efeitos diretos da droga na cardiolipina, colocando em causa a função mitocondrial. Drogas que afetem a replicação do DNA ou a síntese proteica poderão afetar a capacidade bioenergética mitocondrial de forma prolongada (Dykens e Will, 2007). Para além disso, muitas drogas podem causar danos irreversíveis, através da alteração da permeabilidade de certos poros, levando à libertação de fatores pró-

apoptóticos, como o citocromo *c* e alterações no equilíbrio normal entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, como Bak/Bax e Bcl-2, respetivamente (Dykens e Will, 2007; Kass, 2006).

Assim sendo, a identificação dos agentes terapêuticos com efeitos secundários e a compreensão dos mecanismos destes efeitos será um passo importante para a produção de novas drogas sem efeitos secundários ou pelo menos minimizados (Dykens e Will, 2007; Pereira et al., 2009; Szewczyk e Wojtczak, 2002). Para tal, são muito úteis os trabalhos experimentais realizados com produtos farmacêuticos, em concentrações que são superiores às encontradas em condições terapêuticas, e que potencialmente irão atingir as mitocôndrias pelas vias secundárias (Szewczyk e Wojtczak, 2002).

1.5 Propriedades Antioxidantes do Propofol

O propofol é um composto aromático da classe dos fenóis que tem sido relatado como antioxidante (Eriksson et al., 1992; Murphy et al., 1993), podendo atuar como “*scavenger*” de radicais livres (Green et al., 1994). Usando a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica, Murphy et al., (1993) demonstraram que esta capacidade antioxidante é conferida pela transferência do hidrogénio do grupo hidroxilo para os radicais livres formando o radical fenoxilo (Murphy et al., 1992b), estabilizado por ressonância, que é menos reativo comparativamente aos radicais livres iniciais, como acontece na eliminação do peroxinitrito ($\text{ONOO}^\cdot$), resultante da reação do óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$) e do anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Mouithys-Mickalad et al., 1998).

Foi já demonstrado que o tratamento com propofol aumenta a resistência ao dano oxidativo provocado em eritrócitos (Murphy et al., 1992a). Ratos anestesiados com propofol apresentaram uma menor peroxidação lipídica (LPO) nos microssomas hepáticos, e concomitantemente uma inibição na indução da permeabilização de Ca^{2+} na mitocôndria (Eriksson et al., 1992).

O propofol inibe a LPO em microssomas, mitocôndria de fígado de rato e sinaptossomas (Musacchio et al., 1991) e em trabalhos onde se retirou o α -tocoferol de microssomas de fígado de rato, o propofol demonstrou poder substituir esta vitamina ao nível da atividade antioxidante, sugerindo que o propofol atue nas membranas devido à sua solubilidade no seio lipídico (Aarts et al., 1995).

O propofol protege a célula contra o efeito inibitório da viabilidade celular induzido pelo 2,2- azobis amidinopropano (AAPH), um gerador de radicais livres que provoca a hemólise de eritrócitos (Navapurkar et al., 1998).

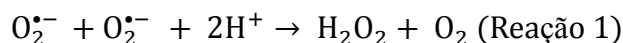
1.6 Enzimas antioxidantes na defesa contra ROS

As espécies reativas podem ter origem exógena (relacionadas com fatores externos) ou endógena, resultantes da produção das espécies reativas em sistemas biológicos (e.g. lisossomas, peroxissomas, núcleo, retículo endoplasmático, membrana plasmática, citoplasma, e na mitocôndria). A respiração mitocondrial, que é responsável pelo consumo de mais de 90% de oxigénio celular favorece a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), como o $O_2^{\bullet-}$ e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Perante este tipo de situações, a célula desenvolveu estratégias eficientes para controlar a atividade deletéria de ROS, e em algumas situações beneficiar da sua atividade.

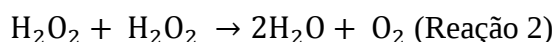
Sendo uma dessas estratégias, a utilização de moléculas antioxidantes, que retardam ou impedem a oxidação de outras moléculas. Existem antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas A, E e C, a ubiquinona, a glutathione e de natureza enzimática, como sejam as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), e glutathione redutase (GR).

A SOD é uma enzima antioxidante que se encontra em diferentes tipos de organismos e locais distintos na célula (Kim et al., 2000). As mais importantes a nível dos animais eucariotas são a CuZnSOD, que se encontra geralmente no citoplasma e a MnSOD presente na matriz mitocondrial.

A SOD converte o radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e oxigénio (Reação 1).



A CAT é uma hemoproteína antioxidante intracelular, que catalisa a decomposição de H_2O_2 em água e oxigénio (Reação 2).

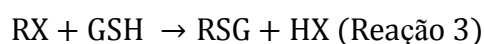


A CAT encontra-se em todos os organismos eucariotas aeróbios, distribuída por todos os órgãos, mas especial relevância a nível hepático. A nível celular encontra-se maioritariamente, nos peroxissomas (Del Rio et al., 1977), apesar de já ter sido

detetada em mitocôndrias de coração de rato (Nohl e Hegner, 1978), microssomas, citoplasma (Thomas e Aust, 1985) e eritrócitos (Winterbourn e Stern, 1987).

Na ausência desta enzima, há aumento da ocorrência de apoptose, inflamação, aparecimento de tumores, envelhecimento acelerado e mutagénese. (Chelikani et al., 2005).

A GST é uma enzima antioxidante de grande importância que está presente em eucariotas e procariotas. A sua atividade permite a eliminação de hidroperóxidos lipídicos produzidos pela ação de radicais livres (Berhane et al., 1994). Catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com uma variedade de substratos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, facilitando o ataque nucleofílico do GSH, resultando da ligação deste ao átomo electrofílico do substrato (Reação 3).



A capacidade antioxidante desta enzima é crucial contra o stresse oxidativo, desenvolvimento neoplásico, e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (Babbitt, 2000).

A GR é uma enzima presente em animais, plantas, bactérias e fungos (Ernest e Kim, 1973; Young e Conn, 1956). Trata-se de uma flavoproteína que catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) em GSH, na presença do cofator NADPH (Reação 4).



Esta enzima é essencial para a reciclagem da glutathione reduzida no sistema celular, o qual funciona como desintoxicante. Desempenha também funções em processos biológicos, como a síntese de proteínas, redução de nucleótidos trifosfatos (NTPs) em desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), armazenamento e transporte de cisteína e pode também estar envolvida na regulação do ciclo celular e termotolerância (Champe et al., 1994).

1.7 Estudos prévios

Navapurkar et al., (1998) propôs a possibilidade do propofol ter uma ação protetora contra o stress oxidativo, causado por radicais livres no fígado. Podendo este acontecimento dever-se à restauração do efeito protetor da glutathione (Aarts et al.,

1995). Através da avaliação da resistência à LPO, observou-se uma redução da ação dos radicais livres pelo propofol em microssomas e mitocôndrias isoladas (Acco et al., 2004). A diminuição dos radicais livres pelo propofol foi também proposto como um mecanismo de estabilização da membrana mitocondrial na presença de Ca^{2+} , inibindo a abertura do poro mitocondrial durante o stress oxidativo (Eriksson, 1991).

Este anestésico é comparado com o BHA (Mistura de dois isômeros, o 2 e o 3-*terc*-butil-4-hidroxianiso, BHT (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) e α -tocoferol (Tsuchiya et al., 1994; Tsuchiya et al., 1992) em muitos dos trabalhos realizados para perceber o seu potencial na defesa do organismo contra os ROS. Verificou-se que o propofol tem capacidade antioxidante similar, ou até superior aqueles antioxidantes de referência, assumindo um papel de destaque na capacidade redutiva, na capacidade de quelatação de íons de ferro, e “*scavenger*” do radical anião superóxido, e do peróxido de hidrogénio (Gulcin et al., 2005).

O propofol torna os eritrócitos mais resistentes ao stresse físico e aumenta a fluidez das membranas tornando-as menos suscetíveis à lise (Tsuchiya et al., 2002). A fluidez das membranas tem um papel crucial na estabilidade dos eritrócitos (Araki e Rifkind, 1981) tornando-os mais resistentes à ação de detergentes e condições hipotónicas. Tsuchiya et al. (2002) realizaram um estudo com pacientes submetidos a cirurgia, demonstrando a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do propofol.

Para além destes efeitos protetores no fígado, acredita-se que o propofol afeta o metabolismo energético da mitocôndria. O propofol em concentrações superiores a 75 μM , quando adicionado em suspensões mitocondriais de fígado de rato parece ter uma ação consistente ao nível da diminuição do potencial elétrico transmembranar. Porém, a síntese de ATP só é afetada pelo propofol com concentrações na ordem dos 100 μM ou quando a ação da ATP sintase é limitada pela adição de oligomicina (Branca et al., 1991a; Branca et al., 1991b). Mais recentemente foi demonstrado que a presença em simultâneo do propofol (200 μM) e do nitrosoglutationa (200 ou 250 μM) como precursores do óxido nítrico têm um efeito sinérgico na diminuição da respiração estimulada por ADP, no potencial transmembranar e na síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Stevanato et al. 2001). Foi também demonstrado em fígado de ratos gordos *in vitro*, que o propofol em concentrações superiores a 100 mM aumenta o consumo de oxigénio e diminui a gliconeogénese

(Acco et al. 2004). Acco et al. (2004) defendem que a maioria dos efeitos do propofol são provavelmente devido à diminuição da fosforilação oxidativa.

O propofol pode alterar, por diversos mecanismos, a capacidade oxidativa de mitocôndrias isoladas do fígado de rato, promovendo o desacoplamento devido ao aumento da permeabilidade aos prótons da membrana mitocondrial interna (Branca et al., 1991b).

O propofol também pode inibir o complexo I da cadeia respiratória (Rigoulet et al., 1996; Stevanato et al., 2001), no entanto, as causas da inibição podem variar de acordo com as condições experimentais (Stevanato et al., 2001). Segundo Rigoulet et al. (1996), por outro lado, o complexo II é apenas inibido em concentrações muito elevadas de propofol.

O propofol também altera significativamente o metabolismo mitocondrial e o transporte dos ácidos gordos, por indução da beta-oxidação (Vasile et al., 2003).

Estudos *in vitro*, demonstraram que nos sinaptossomas do cérebro, o propofol pode inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, podendo também afetar proteínas desacopladoras na membrana interna, desacoplando a cadeia de transporte de elétrons da produção de ATP (Muravchick e Levy, 2006).

II - Objetivo

2. Objetivo

Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* sugerem que o propofol pode interferir ao nível da bioenergética das mitocôndrias hepáticas. Sendo também importante verificar o potencial efeito da anestesia com propofol num modelo anestésico *in vivo*. Este trabalho teve também como objetivo a avaliação da atividade da anestesia com propofol ao nível do stresse oxidativo e das enzimas antioxidantes em fígado de ratos anestesiados com duas doses clínicas (25 e 62,5 mg/kg/h). Assim pretende-se avaliar eventuais alterações da funcionalidade mitocondrial, assim como, a resposta antioxidante e stresse oxidativo ao nível da mitocôndria.

III – Trabalho Experimental

Effect of propofol anaesthesia on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress of liver rat

3.1 Abstract

Aims: Propofol (2,6-diisopropylphenol) is a potent intravenous (i.v.) anaesthetic which is predominately hepatically metabolized. However it can cause hepatotoxicity by affecting mitochondrial bioenergetics. So far, the molecular mechanisms for propofol-induced hepatotoxicity have not been fully elucidated. The aim of the present work was to investigate the action of propofol anaesthesia with two clinical doses (25 and 62.5 mg/kg/h) in mitochondrial rat liver and also evaluate the effect of propofol in liver enzymes related to oxidative stress biomarkers and compare with control animals.

Main methods: Liver mitochondria for each treatment were isolated and respiratory parameters evaluated by oxygen consumption, as well measured mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$), extramitochondrial free Ca^{2+} , mitochondrial enzyme activities and enzymatic antioxidant activities (SOD, CAT, GR, GST). Oxidative stress biomarkers were also evaluated (GSH/GSSG and LPO).

Key findings: Mitochondrial transmembrane electric potential was decreased by propofol in a concentration dependent manner. The mitochondria treated with the highest propofol show a lower capacity to accumulate calcium. No difference was observed in the evaluation of GSH/GSSG ratio between the two treatments and control.

Significance: The results of this study support the hypothesis that propofol anaesthesia induces calcium overload and liver injury via a mechanism dependent on mitochondrial permeability transition (MPT).

Keywords: Propofol; Anaesthesia; Rat liver mitochondria; Bioenergetics; Oxidative stress.

Article submitted to Life Sciences journal.

3.2 Introduction

Propofol (2,6-diisopropylphenol) is a potent i.v. hypnotic agent (Fodale and La Monaca, 2008), widely used for sedation, in general anaesthesia and in intensive care medicine (Fagerlund et al., 2010). Propofol is a short-acting anaesthetic (Sztark et al., 1995), with a rapid onset of action with a dose-related hypnotic effect (Marik, 2004) and rapid recovery, even after prolonged use (Fodale and La Monaca, 2008; Marik, 2004).

Propofol is a highly lipophilic molecule which is predominately hepatically metabolized (Rison and Ko, 2009), by hepatic conjugation to inactive glucuronide (Raoof et al., 1996) or sulphated metabolites (Court et al., 2001). However, drug-induced liver injury nowadays represents a major cause of acute liver failure (ALF) in developed countries (Kneiseler et al., 2010), being the commonest reason for the termination of drugs in their pre-clinical development but is also the most frequent reason for the withdrawal of approved drugs from the market (Kass, 2006). So far, the molecular mechanisms underlying the hepatotoxicity of propofol have not been fully elucidated.

A large number of pharmaceutical, natural, and environmental chemicals manifest their toxicity by interfering with mitochondrial bioenergetics (Moreno et al., 2007). However, some aspects of drug-mitochondria interactions may still be underestimated because of the difficulty in foreseeing and understanding all potential implications of the complex pathophysiology of mitochondria (Scatena et al., 2007).

Several studies *in vitro* demonstrated propofol can inhibit the respiratory chain at the level of complex I and complex II (Rigoulet et al., 1996), decrease the mitochondrial $\Delta\Psi$ and inhibit the ATP synthetase (Branca et al., 1991a; Branca et al., 1991b) on rat liver mitochondria.

Liver is the principal organ responsible for detoxification processes and mitochondria constitute the major energy-producing organelles of the hepatocyte. Any interference with mitochondrial bioenergetics is known to be a part of cell injury process by a multiplicity of mechanisms and assorted agents (Wallace, 2008). In spite of this, mitochondria have proved to be an excellent model to evaluate the many xenobiotics' effects on cell toxicity and the obtained data are usually in good agreement with cytotoxicity parameters reported in cell cultures and whole organisms (Haubenstricker et al., 1990; Knobloch et al., 1990).

Propofol is an alkyl phenol structurally similar with α -tocopherol, BHT and BHA (Gulcin et al., 2005), the antioxidant activity of propofol results partly from this phenolic chemical structure with an OH-group (Aarts et al., 1995). Although it has never been described that propofol has pro-oxidant activity, there are some compounds that can function as pro-oxidants or antioxidants depending on different conditions. Many times the concentration of the antioxidant and the presence of oxygen or metal ions will dictate how the chemical acts.

For this reason we considered performing an experimental study to measure the action of propofol anaesthesia with two clinical doses in mitochondrial rat liver and also evaluate the effect of propofol in liver enzymes related to oxidative stress biomarkers.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Chemicals

Propofol (Propofol Lipuro® 1 % and 2 %) and Propofol Vehicle (Intralipid® 20 %) was acquired from B. Braun Melsungen, Germany and Fresenius Kabi AG, Germany, respectively. Calcium Green 5-N (Molecular Probes®) was purchased from Invitrogen, Life Technologies S.A, Spain. All other reagents and chemicals used were of the highest grade of purity commercially available.

3.3.2 Experimental design

Eighteen male outbred Wistar rats (300 ± 22 g) were obtained from a commercial supplier (Charles River, Barcelona, Spain). All procedures were carried out under personal and project licenses from the national competent authority for animal protection Direção Geral de Veterinária, Lisbon, Portugal. The rats were maintained on a 12 h light/dark cycle, with ad libitum access to food and water.. Animals were divided randomly into groups of four animals per cage (59.5 x 38 x 20 cm).

Anaesthesia was initially induced in a chamber with 7–8% sevoflurane in a 100% oxygen (2 L/min), until postural reflexes lost. Animals were then transferred to a face mask delivery and gas scavenging system and maintained with 2.5% sevoflurane in oxygen (1 L/min). During this period they were placed in lateral recumbency on bedding (VetBed; Kennel Needs and Feeds, Morpeth, UK) with a heating blanket (Harvard Apparatus; Edenbridge, Kent, UK) to maintained body temperature. Inhalatory anaesthesia was maintained until lateral tail vein cannulation with a plastic catheter (B Braun Abbocath G24). Then i.v. anaesthesia started with a propofol bolus 10 mg/kg with a constant rate of 200 ml/h with a syringe pump (Asena GH; Alaris Medical Systems, San Diego, CA). Anaesthesia was maintained for 4 hours with a propofol infusion (25 or 62.5 mg/kg/h, propofol 1% or 2% respectively). Control group was also cannulated in tail vein with a plastic catheter with sevoflurane anaesthesia at the same conditions of anaesthetic groups and perfused with propofol vehicle during 4 hours with a rate 3.125 ml/kg/h.

3.3.3 Isolation of liver mitochondrial

Mitochondria were extracted from a homogenate of rat liver by differential centrifugation according to conventional methods (Gazzotti et al., 1997). Briefly, liver mitochondria were isolated from a portion of the liver and homogenized in homogenization medium containing 250 mM manitol, 75 mM sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA and 0.1 % defatted BSA (bovine serum albumin) in a Potter homogenizer with a Teflon pestle. The homogenate was centrifuged at 700 g for 10 min and the supernatant at 8,000 g for 10 min to precipitate mitochondria that were washed in the same conditions. EDTA, EGTA and defatted BSA were omitted from the final washing medium and adjusted to pH 7.2. Mitochondrial suspensions were used immediately after isolation or frozen, including the remainder tissue, in liquid N₂ and kept at -80 °C. Mitochondrial samples, twice thawed and frozen, were homogenized and the resulting submitochondrial membranes were used for the determination of enzyme activities and oxidative stress markers. Protein content of samples was determined using BSA as standard.

3.3.4 Evaluation of liver mitochondrial function

Oxygen consumption of isolated liver mitochondria was monitored polarographically with a Clark-type oxygen electrode in a Hansatech oxygraph (Hansatech Instruments, England), using succinate (5 mM) as substrate, at 25 °C, in a final volume of 1 mL, with constant stirring. The standard respiratory medium consisted of sucrose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 5 mM and HEPES 5 mM at pH 7.2. Mitochondria were suspended at a concentration of 0.5 mg/mL in the respiratory medium and protein concentration was determined by the biuret method using bovine serum albumin as a standard (Gornall et al., 1949). State 4 respiration was measured in the presence of succinate 5 mM. ADP (50 nmol) was added to induce state 3 respiration. The respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio between state 3 and state 4 respiration. The mitochondrial $\Delta\Psi$ was estimated with a tetraphenylphosphonium cation (TPP⁺) electrode according to the equation of Kamo et al., without correction for the “passive” binding contribution of TPP⁺ to the mitochondrial membranes (as the purpose of the experiment was to show relative changes in the potential rather than absolute values). A matrix volume of 1.1 μ L/mg

protein was assumed and valinomycin was used to calibrate the basal line. Reactions were carried out at 25 °C in 1.0 mL of the reaction media (the same medium as described for oxygen consumption experiments) supplemented with TPP⁺ 3 µM and 0.5 mg of mitochondria. Mitochondria were energized with 5 mM succinate.

3.3.5 Mitochondrial Ca²⁺-induced calcium release

The hexapotassium salt of the fluorescence probe Calcium Green 5-N was used to measure extramitochondrial free Ca²⁺ (Rajdev and Reynolds, 1993). 0.6 mg of protein was resuspended in 2 mL of medium containing 200 mM sucrose, 10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM KH₂PO₄ and 10 µM EGTA, supplemented with 3 µM rotenone, 0.1 µg oligomycin. Free Ca²⁺ was monitored with 100-nM Calcium Green 5-N. Fluorescence (excitation 505 nm; emission 531 nm) was recorded continuously in a water-jacketed cuvette holder, at 25 °C, for 50 s, prior to the addition of calcium (CaCl₂) to a final concentration of 10 µM. It was monitored continuously for an additional 6 min, after energized with 6 mM succinate, and stopped with excess EGTA to obtain the basal line. Calcium fluxes are expressed as relative fluorescence units (RFU).

3.3.6 Mitochondrial enzyme activities

Complex I activity was determined by following the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt (NADH) at 340 nm with a reference wavelength of 425 nm. The assay was performed in a buffer containing 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, 2 mM KCN, 5 mM MgCl₂, 2.5 mg/mL BSA, 0.03 mM antimycin, 0.1 mM decylubiquinone and 0.3 mM NADH. The reaction was initiated by adding mitochondria (0.3-0.6 mg/mL). Complex II activity was measured by following the reduction of DCIP at 600 nm. The assay buffer contained 50 mM potassium phosphate, pH 7.4, 20 mM succinate, 2 mM KCN, 50 µM DCIP, 0.025 mM rotenone, and 0.03 mM antimycin. Mitochondria (0.3-0.6 mg/mL) were added prior to initiation of the reaction. The reaction was initiated by adding 56 µM decylubiquinone. Complex III was measured by following the reduction of cytochrome c at 550 nm with a reference wavelength of 550 nm. The assay buffer contained 5 mM potassium phosphate, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM KCN, 0.1 %

tryton x100, and 32 μM oxidized cytochrome *c* using mitochondria (0.3-0.6 mg/mL). The reaction was initiated by adding 35 μM decylubiquinol. Decylubiquinol was made according to (Luo et al., 2008). Complex IV activity was measured by following the oxidation of reduced cytochrome *c* at 550 nm. The assay buffer used contained 10 mM Tris-HCl and 120 mM KCl, pH 7.0 and it was used mitochondria (0.3-0.6 mg/mL). The reaction was initiated by adding 11 μM reduced ferrocytochrome *c*. ATP synthase activity was measured by monitoring the pH changes associated with ATP hydrolysis (Madeira et al., 1974). The reaction was carried out in 1.5 mL of the reaction medium containing sucrose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, and KH_2PO_4 2 mM (pH 7.2), supplemented with 5 mM succinate and 0.5 mg of mitochondrial protein. The reaction was initiated by the addition of ADP (400 μM) to the mitochondrial suspension. The pH change was evaluated continuously on a strip chart recorder (Model BD 111, Kipp and Zonen, The Netherlands). At the end of the reaction, pH titration was performed, using HCl (100 nM). Enzyme activity was calculated using the slope of the curve for change in pH after the addition of ADP. Citrate synthase activity was also assayed by following the reduction of Acetil-CoA to citrate at 412 nm. The assay buffer contained 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.01 mM DTNB, 0.02 % Triton x100, 1 mM oxaloacetate and 0.37 mM Acetil-CoA. The reaction was initiated by adding mitochondria (0.3-0.6 mg/mL). All assays were performed at 30 °C.

3.3.7 Enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities

The activity of superoxide dismutase (SOD) was assayed by measuring its ability to inhibit the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), at 560 nm. SOD activity was determined according to the method of Paya et al. (1992), using 0.1 mM hypoxanthine and 1 U xanthine oxidase as O_2^- source and 0.1 mM NBT as O_2^- scavenger in KH_2PO_4 buffer (pH 7.4), at 25 °C. The activity of catalase (CAT) was measured by the oxygraphic method using a Clark oxygen electrode, according to (Del Rio et al., 1977). Changes in oxygen concentration were measured in the incubation medium made of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4 and 10 mM H_2O_2 . Considering a very high activity of the enzyme, the samples were diluted 2000-fold in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. Glutathione S-transferase activity (GST) was

assayed spectrophotometrically at 340 nm as the formation of the thioether between glutathione reduced form (GSH) and 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (CDNB), as described by Habig et al. (1996). The assay mixture contained 100 mM phosphate buffer, pH 7.0, 100 mM GSH and 100 mM CDNB and the reaction was monitored at 25 °C. Considering a very high activity of the enzyme, the samples were diluted 2-fold in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. Glutathione reductase (GR) activity was measured according to the method of Carlberg and Mannervik (1975). The assay mixture consisted of 1 mM EDTA, 100 mM oxidized glutathione, 10 mM NADPH, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6). The enzyme activity was quantitated at 25 °C by measuring the disappearance of NADPH at 340 nm.

Both GSH and GSSG, glutathione in reduced and oxidized states respectively, were measured by a slightly modified fluorometric method (Hissin and Hilf, 1976). Mitochondrial fractions were deproteinized with ice-cold TCA 10% and centrifuged at 20 000g ×15 min. For GSH measurement, supernatants were incubated with ethanolic ophthal-aldehyde solution (1 mg/mL) and phosphate buffer (100 mM sodium phosphate, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) during 15 minutes at room temperature. The fluorescence of the resultant samples was measured at 340 nm excitation and 420 nm emission. For GSSG measurement, aliquots of supernatants were pre-incubated with N-ethylmaleimide solution (NEM 40 mM) for 45 min at room temperature, and then alkalinized with 0.1 M NaOH and incubated with ophthalaldehyde solution for 15 minutes at room temperature. The fluorescence was then measured. GSH and GSSG concentrations were calculated according to standard curves prepared accordingly.

The lipid peroxidation (LPO) was determined by the thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) according to the method of Ohkawa et al. (1979), using malonyldialdehyde (MDA), a product formed due to the peroxidation of lipids. Briefly, frozen liver tissue was homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 175 mM KCl. The mitochondria suspension was added to TCA–TBA–HCl stock solution (15% w/v trichloroacetic acid (TCA), 0.375% w/v TBA, 0.25 N HCl), together with 0.02% w/v BHT (v/v = 1/1). This amount of BHT completely prevents the formation of any nonspecific TBARS. The solution was kept in a boiling water bath for 15 min and after cooling, the precipitate was removed by

centrifuging at 4000 g for 10 min. TBARS in the supernatant was determined at 532 nm.

3.3.8 Statistical analysis

The results are presented as means $\pm$ SEM from six independent experiments. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Multiple comparisons were performed using one-way ANOVA. Results were analyzed using the one-way ANOVA test using a level of significance of $P < 0.05$.

3.4 Results

3.4.1 Mitochondrial respiration

The mitochondrial respiration was evaluated in state 3 (ADP-stimulated), state 4 (ADP-depleted) and uncoupled respiration (FCCP-stimulated). When using pyruvate/malate as substrate, the state-3 respiration was not significantly changed by propofol treatment, in both two used doses, when compared with control group. When using the same substrate, state-4 respiration was increased in about 97 % ($P=0.0043$) for rats treated with 25 mg/kg/h and no difference ($P=0.6255$) was observed for rats treated with 62.5 mg/kg/h, when comparing to control group (Table 1). Yet, when we compare the results obtained for the two groups treated with propofol we can see a significant difference ($P=0.0053$) between these two groups. For the uncoupled respiration (stimulated by FCCP), we observed a slight and non-significant ($P=0.3708$) stimulation for the group treated with 25 mg/kg/h while for the group treated with for the highest dose it was determined a significant ($P=0.0880$) decrease of about 30 %, when compared with control group (placebo). Once more the differences between the two propofol-treated groups were statistically significant ($P=0.0106$) (Table 1). When using succinate as substrate, the state-3 respiration was decreased of about 10 % ($P=0.2839$) and 25 % ($P=0.0107$), respectively, for rats treated with 25 mg/kg/h and 62.5 mg/kg/h when compared with control group. No significant differences were observed between treated groups ($P=0.1411$). Considering both state-4 respiration and uncoupled respiration, with succinate as respiratory substrate, no differences were observed between groups (Table 1). The RCR is a measure of the dependence of the respiratory rate on oxidative phosphorylation. A decrease of the RCR ratio generally indicates that the structural integrity of mitochondria has been affected. ADP/O ratio gives us an indication of the coupling between respiration and phosphorylation. RCR was decreased in about 47 % ($P=0.0130$) and 12% ($P=0.4256$), respectively for groups treated with 25 and 62.5 mg/kg/h, as compared to control group and using pyruvate/malate as substrate. Also there is a significant difference between the two groups treated with propofol ($P=0.0025$). When using succinate as substrate, it was only observed a decrease of 26% between control as the group treated with 62.5 mg/kg/h, nevertheless this difference were not statistically significant ($P=0.0976$).

When using pyruvate/malate as substrate, ADP/O was decreased in about 13 % ($P=0.4403$) and increased in about 15 % ($P=0.3504$) for groups treated with 25 and 62.5 mg/kg/h, respectively. Although, when using succinate, the ratio was decreased in about 20 % ($P=0.1193$) and 8 % ($P=0.5442$), respectively for 25 and 62.5 mg/kg/h, when comparing to control group.

Table 1. Effects of different doses of propofol anaesthesia on the respiration of isolated mitochondria of rat liver.

Propofol (mg/Kg/h)	Pyruvate/malate as substrate				
	state 3 respiration	state 4 respiration	Uncoupled respiration	ADP/O	RCR
0	12.72 ± 4.38 ^a	5.27 ± 0.76 ^a	14.53 ± 4.69 ^a	3.23 ± 0.97 ^a	2.43 ± 0.82 ^a
25	13.74 ± 4.45 ^a	10.99 ± 1.96 ^b	17.27 ± 4.45 ^a	2.80 ± 1.17 ^a	1.29 ± 0.44 ^b
62.5	11.48 ± 3.52 ^a	5.41 ± 1.57 ^a	10.18 ± 1.74 ^b	3.72 ± 0.99 ^a	2.15 ± 0.36 ^a
Propofol (mg/Kg/h)	Succinate as substrate				
	state 3 respiration	state 4 respiration	Uncoupled respiration	ADP/O	RCR
0	41.52 ± 5.34 ^a	13.97 ± 4.18 ^a	97.50 ± 15.91 ^a	3.85 ± 1.19 ^a	3.54 ± 0.93 ^a
25	37.73 ± 7.72 ^{a,b}	11.74 ± 3.33 ^a	83.52 ± 14.95 ^a	3.07 ± 0.65 ^a	3.44 ± 0.79 ^a
62.5	31.29 ± 8.55 ^b	13.76 ± 3.37 ^a	87.62 ± 18.23 ^a	3.55 ± 0.85 ^a	2.61 ± 1.18 ^a

Respiration values (mean ± SD) are expressed as nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ protein. $P < 0.05$, n = 6.

3.4.2 Mitochondrial transmembrane potential

Liver mitochondria isolated from rat developed a maximum $\Delta\Psi$ of about - 207.0 ± 1.57 mV upon the addition of a respiratory substrate (succinate). Propofol treatment promoted a decrease in $\Delta\Psi$, which was dependent on the concentration. However only the highest propofol dose was able to produce a difference statistically significant when compared with control ($P=0.0026$) and the group treated with the lowest propofol dose ($P=0.0011$). Regarding the time and repolarization rate due to ADP phosphorylation (Figure 4), no significant differences were observed between groups.

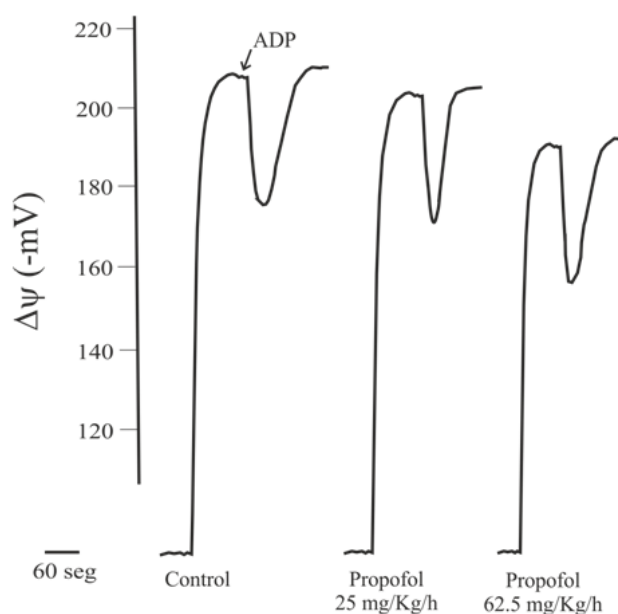


Figure 4. Effects of different doses of propofol anaesthesia in rat liver mitochondrial transmembrane potential. Mitochondria (0.5 mg protein) were resuspended in 1 mL of the standard respiration medium supplemented with TPP⁺ 3 μ M. Mitochondria were energized with 5 mM succinate. The traces represent typical recordings from several experiments with four different mitochondrial preparations.

3.4.3 Mitochondrial Ca²⁺-induced calcium release

Mitochondrial calcium accumulation was evaluated in energized mitochondria by the use of a low affinity calcium-sensitive probe, Calcium Green-5N in the assay medium. Mitochondria were energized with calcium present in the assay medium, and calcium accumulation was followed by a decrease in fluorescence intensity (reflecting decreased calcium concentration in the medium and accumulation in mitochondria). Mitochondria possess a finite capacity for accumulating calcium before undergoing the calcium-dependent mitochondria permeability transition (MPT). Representative traces are shown in figure 5. The results show that treatment with the highest propofol dose (62.5 mg/kg/h) significantly decreases the capacity of calcium accumulation by mitochondria, which is reflected in high and rapid increase in fluorescence resulting from release of calcium, as a consequence of mitochondria permeability transition pore (MPTP) opening. Contrarily the treatment with the lowest propofol dose (25 mg/kg/h) seems to inhibit MPT induced by calcium. As a control assay we used cyclosporin A which allow us to confirm the increase in the fluorescence due calcium mitochondrial release was a consequence of MPTP opening, since it was inhibited in all groups when cyclosporine was present in the medium.

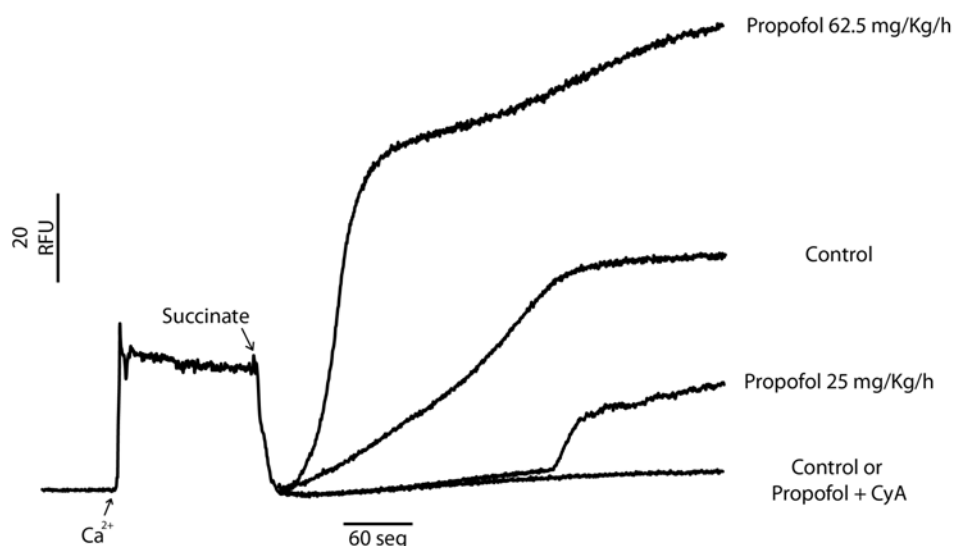


Figure 5. Effects of different doses of propofol anaesthesia in rat liver Ca^{2+} -induced calcium release. Mitochondria (0.6 mg protein) were resuspended in 2 mL of the standard medium supplemented with 3 μM rotenone, 0.1 μg oligomycin at 25 °C, before energization with 5 mM succinate. Calcium (10 μM) was added as indicated. Excess EGTA was added to confirm the MPTP opening. The traces represent typical recordings from several experiments with four different mitochondrial preparations.

3.4.4 Mitochondrial enzymatic activities

Studies of enzymatic activities of respiratory complexes were performed in order to localize which and if respiratory complexes are affected by the treatment with two different propofol doses. The activities of the respiratory chain complexes NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate-ubiquinone oxidoreductase (complex II), ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (complex III) and cytochrome *c* oxidase (complex IV) are shown in Table 2.

Table 2. Effects of different doses of propofol anaesthesia on the activity of mitochondrial complexes in rat liver.

Propofol (mg/Kg/h)	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	ATP Synthase
0	4.48 ± 1.42 ^a	8.34 ± 2.49 ^a	1.46 ± 0.29 ^a	7.76 ± 1.18 ^a	42.04 ± 24.76 ^a
25	3.25 ± 1.1 ^a	8.18 ± 2.06 ^a	1.41 ± 0.19 ^a	7.58 ± 1.52 ^a	53.28 ± 24.72 ^a
62.5	7.40 ± 1.39 ^c	15.0 ± 2.21 ^b	1.34 ± 0.20 ^a	7.55 ± 2.07 ^a	45.53 ± 16.25 ^a

Complexes activity values (means ± SD) are expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$. $P < 0.05$, $n = 6$.

For the complex I activity, no difference was observed between control group and the group treated with propofol 25 mg/kg/h. Nevertheless, for the group treated with 62.5 mg/kg/h, it was observed an increase of about 65 % resulting in a significant difference when compared to control group ($P=0.0075$). The effects were

the same for complex II activity where no differences were observed between control group and the group treated with the lowest propofol dose. For the group treated with the highest propofol dose, it was observed an increase of about 80 % resulting in a significant difference when compared to control group ($P=0.0012$). Relatively to complex III, complex IV and ATP synthase activities no differences were found between the three groups.

3.4.5 Enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities

The effect of propofol treatment on rat liver antioxidant enzymes as well on the ratio GSH/GSSG and LPO was evaluated (Table 3).

Table 3. Effects of different doses of propofol anaesthesia on antioxidant enzymes and oxidative stress biomarkers in rat liver homogenates.

Propofol (mg/Kg/h)	SOD	CAT	GR	GST	GSH/GSSG	LPO
0	2.448 ± 0.25 ^a	0.4840 ± 0.05 ^a	0.1749 ± 0.01 ^a	0.5648 ± 0.02 ^a	2.381 ± 0.14 ^a	0.3423 ± 0.04 ^a
25	4.133 ± 0.32 ^b	0.8861 ± 0.05 ^b	0.2665 ± 0.03 ^b	0.7189 ± 0.03 ^b	2.283 ± 0.12 ^a	0.1820 ± 0.03 ^b
62.5	2.536 ± 0.21 ^{a,c}	0.5506 ± 0.08 ^{a,c}	0.3037 ± 0.02 ^{c,b}	0.6337 ± 0.05 ^{a,b}	2.273 ± 0.09 ^a	0.2084 ± 0.03 ^{b,c}

Results (mean ± SEM) are expressed as: SOD ($\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$); CAT, GR and GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$); LPO ($\text{nmol mg}^{-1} \text{protein}$). $P < 0.05$, $n = 6$.

SOD activity showed an increase of about 69 % ($P=0.0012$) for group treated with the lowest dose, as compared to control. Still, for group treated with the highest dose there was no significant alteration ($P=0.7893$) as compared to control group. Similarly, the analysis of CAT activity allows to verify an increase of about 83 % ($P=0.0008$) group treated with the lowest dose, when compared to control group. For the group treated with the highest dose, it was observed a non-significant increase of about 14 % ($P=0.5074$) relatively to control group. GR activity showed a significant increase in activity which was dependent on the concentration of propofol, about 52 % ($P=0.0159$) and 74 % ($P=0.0003$), respectively for 25 mg/kg/h and 62.5 mg/kg/h, when compared to control group. Contrary to that observed for other SOD, CAT and GR, treatment with propofol did not cause any significant change in glutathione S-transferase (GST) activity when compared with the control group.

Concerning GSH/GSSG ratio which is considered a good indicator for evaluation of oxidative stress, it was not observed a significantly decreased in both propofol treatments when compared with control group ($P<0.05$).

The LPO was determined by the thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) which are present in Table 3. In propofol-treated groups, hepatic TBARS production showed a significantly decrease of about 47 % ($P=0.0055$) and 39 % ($P=0.0224$), respectively for the groups treated with the lowest and the highest propofol doses, as compared to control group ($P<0.05$).

3.5 Discussion

Propofol is a widely used i.v. anaesthetic agent with a rapid onset, short duration of action and rapid elimination (Bryson et al., 1995). It's chemically similar to phenol-based free-radical scavengers, while its lipophilic nature allows its rapid access to cellular and subcellular membranes compartments (Zeng et al., 2008). Propofol use has raised some concern regarding its potential hepatotoxicity in susceptible patients (Anand et al., 2001). The exact mechanisms of propofol hepatotoxicity have not been fully elucidated. However, some authors suggest that mitochondrial dysfunction could be related to the liver injury promoted by propofol. In fact, *in vitro* studies have demonstrated that propofol can act as a protonophoretic uncoupler in isolated rat liver mitochondria (Branca et al., 1991b; Rigoulet et al., 1996). Nevertheless, this uncoupler effect was attributed to a nonspecific effect at the membrane level, since addition of ADP plus oligomycin before propofol avoids this increase in proton permeability, and in phosphorylating mitochondria, the ATP/O ratio is not significantly affected by propofol addition (Rigoulet et al., 1996). These authors also demonstrated that propofol strongly inhibits state 3 and uncoupled respiration rates, when using complex I substrates. *In vitro* studies shown that propofol decrease the efficiency of energy transduction since it decreases ADP/O and RCR (Acco et al., 2004). Acco et al., (2004) also concluded that the effect of propofol in isolated mitochondria respiring α -ketoglutarate or β -hydroxybutyrate was similar to a previous study using succinate as a respiratory substrate. It was even proposed by Branca et al., (1991a and b) that propofol could affected the generation and/or maintenance of the transmembrane electrical potential while leaving unchanged the coupling between the electron flow in the respiratory chain and the synthesis of ATP.

Despite extensive knowledge of the effects of propofol on isolated liver mitochondria, data are lacking regarding hepatic mitochondrial function of propofol-treated rats, namely and most importantly, the susceptibility of liver mitochondria from treated animals to undergo MPT. The main objective of the present study was to verify if propofol administration to Wistar rats at two different doses (sedation and anaesthesia) could induce mitochondrial alterations comparable to those observed in *in vitro* studies.

A comparative analysis between the results obtained *in vitro* and *in vivo* may not be an easy task it would give us a closer idea of the reality. In fact, not only the

concentrations used *in vitro* may not be similar to those used *in vivo*, additionally propofol *in vivo* will be subject to metabolism and elimination which does not occur *in vitro*. Nevertheless, these observations, the *in vitro* studies raised the possibility that propofol, through its capacity to interfere with mitochondrial bioenergetics, it could have the ability to interfere with the energy production and calcium homeostasis in the hepatocyte, which in turn may constitute a relevant mechanism for propofol-induced hepatotoxicity.

In this work, we see that treatment with propofol (25 mg/kg/h) stimulates state 4 respiration supported by pyruvate/malate and concomitantly leads to a decrease in the RCR since state 3 respiration was not significantly affected. Results obtained with pyruvate/malate do not agree with dose obtained *in vitro*. When using succinate as substrate, it was detected a decrease on the RCR value for the highest dose, like it was observed *in vitro* (Acco et al., 2004). Although these results, the coupling between mitochondrial respiration and phosphorylation was not impaired by propofol anaesthesia, as seen by ADP/O ratio.

Previous studies performed *in vitro* have shown that propofol exhibits many different biological actions in mitochondria such as impairment of calcium accumulation in mitochondria isolated from liver or heart (Branca et al., 1991a; Branca et al., 1995) and modification of inner-membrane proton permeability which leads to a decrease in the transmembrane electric potential with a consequent inhibition on the activity of ATP synthase (Branca et al., 1991a; Branca et al., 1991b). Although the inhibition in the ATP synthase activity, the overall rate of ATP production in isolated mitochondria was not affected which was justified with the rate-limiting effect of the adenine nucleotide translocator in this process (Branca et al., 1991b).

We measured the mitochondrial transmembrane electric potential to determine if propofol treatment could impair hepatic mitochondria (Figure 4). The study of $\Delta\psi$ is essential for an integrated appraisal of the mitochondrial function, since it reflects basic useful energetic relationships. Propofol treatment decreased the energization by succinate in a concentration dependent manner. Yet no significant differences were observed in the $\Delta\psi$ fluctuations linked to the phosphorylation cycle, confirming that the drug treatment did not interfere with the phosphorylation system of mitochondria. However, the slight but significant decrease observed in the maximum $\Delta\psi$ achieved

by succinate oxidation could indicate an inhibition in the mitochondrial respiratory chain or that can act as a protonophore. To further confirm that propofol treatment could impair mitochondrial respiratory chain we measured the activity of complexes (I, II, III and IV). Nevertheless we did not observed any inhibition promoted by propofol treatment, which allow us to corroborate the idea that propofol *in vivo* should not act as classical protonophore as it was also suggested *in vitro* (Rigoulet et al., 1996). Furthermore, our data demonstrate that the highest dose of propofol anaesthesia increase mitochondrial complex I and II activities, but has no effect on the mitochondrial activity of complex III, IV and ATP synthase. Possibly, these results are consequence of a nonspecific effect of propofol at the membrane. Other authors showed a decrease on the mitochondrial activity of complex IV in muscle biopsies, from a child with clinical features of propofol infusion syndrome (PRIS), suggesting a mitochondrial respiratory-chain enzyme deficiency induced by propofol (Vasile et al., 2003).

If propofol acted as a protonophore we should expect an increase in state 4 respiration, nevertheless this was only observed for the lowest dose of propofol when using pyruvate and malate as respiratory substrates. In addition to the disruption in mitochondrial transmembrane potential, the highest dose of propofol exhibited an increase in membrane permeability known as the mitochondrial membrane permeability transition, phenomenon that is now thought to be a central regulatory mechanism for cell death induction (Grimm and Brdiczka, 2007; Kroemer et al., 1998). The inhibition by cyclosporin A is evidence for the induction on the MPT, which is attributed to the Ca/Pi-induced stimulation of hydrogen peroxide generation (Kowaltowski et al., 1996). Once mitochondria membrane permeabilization occurs, cells die either by apoptosis or by necrosis (Kowaltowski and Vercesi, 1999; Nieminen et al., 1995). The results obtained for the lowest dose of propofol could result from a direct interaction with the putative pore, thus causing its closure and also by scavenging of free radicals thus inhibiting its opening during oxidative stress (Eriksson, 1991). Nevertheless, the high susceptibility of pore opening induced by calcium in mitochondria isolated from rats treated with the highest propofol dose may seem contradictory. In fact data clearly shows that liver mitochondria isolated from propofol-treated with the highest dose were not able to accumulate the same amount of calcium and to retain the calcium for the same length of time before its release to

the reaction medium. The induction of MPTP by propofol-treatment could allow cytochrome *c* release, which could result in caspase activation pathway. In fact, it was already observed HL-60 cells treated with propofol resulted in growth inhibition with the formation of apoptotic bodies (Tsuchiya et al., 2002).

Propofol is often used in clinical situations where ROS can be formed and react with most biomolecules including protein, lipids, lipoproteins and DNA (Nordberg and Arner, 2001). In hepatic cytosol, these antioxidant enzymes and GSH work synergistically to cope with the oxidative stress. In the current study, propofol anaesthesia was found to increase the activities of the main antioxidant enzymes, namely; SOD, CAT, GR and GST, strongly enhancing the reduction of ROS. GR was stimulated by propofol in a concentration dependent manner. GSH/GSSG ratio was not significantly affected, since no changes were observed in GSH and GSSG content. GST activity was not significantly different in all three groups, indicating that the process of elimination of propofol is not achieved by conjugation with GSH (reaction catalysed by GST). In fact, propofol liver metabolism is performed by cytochrome P450 (Oda et al., 2001; Yamazaki et al., 2006). Superoxide dismutase was significantly increased by treatment with a lowest propofol dose, whereas the concentration that induce anesthesia there was no significant change. This data are not in agreement with some results obtained in studies performed in rat brain, where it was found that treatment with propofol did not induce significant changes in SOD activity (Green et al., 1994; Hillered et al., 1984). CAT dismutate H₂O₂ produced by SOD that's why CAT is considered by a subsequent enzyme of SOD in the primary enzyme defense against reactive oxygen species and are both present in virtually all types of aerobic cells. Therefore, the increased CAT activity for the group treated with 25 mg/kg/h propofol are closely related with SOD activity. That is to our knowledge this is the first study which evaluates liver CAT activity in rats treated with propofol. Nevertheless, it seems that in brain, propofol treatment did not show any significant alteration (Ozturk et al., 2008).

The increased activity of GR may indicate a possible role of GSH redox cycle on the propofol liver metabolism. In fact, propofol has already pointed as a molecule capable to scavenging lipid peroxides formed in the membrane (Aarts et al., 1995) and it is also expectable that propofol free radicals are regenerated to propofol by GSH.

Concerning LPO, our results demonstrated that propofol anaesthesia results in a lower degree of mitochondrial lipid peroxidation, regardless the dose. This data are in agreement with many other reports indicating the propofol can acts as a chain reaction-breaking antioxidant (Eriksson et al., 1992; Manataki et al., 2001). The ability of the anaesthetic to inhibit the increase in lipid peroxide production may stem from an antioxidant effect of propofol itself, or of its commercial solvent Intralipid. Since, the group control received the solvent Intralipid, we can conclude that the inhibition of lipid peroxidation was due exclusively to the antioxidant activity of propofol, which is consistent with the results obtained by others (De La Cruz et al., 1998; Demiryurek et al., 1998).

The inhibitory effects of propofol on malondialdehyde production indicate that its antiperoxidative action is comparable with that of α -tocoferol (Aarts et al., 1995). These molecules bind to cell membranes or to phospholipids to form free radicals, and terminate lipid peroxidation by reacting with lipid peroxy radicals to form the non-reactive phenoxyl radical (Yamaguchi et al., 2000). According to the same authors (Yamaguchi et al., 2000), propofol may act through a similar mechanism. Its antioxidant effect results from the inhibition of lipid peroxidation by the formation of relatively low reactive free radicals that disrupt the chain of formation of other radicals potentially being able to cause greater damage to cell membranes (Hara et al., 1990).

3.6 Conclusion

In conclusion, it can be said that propofol exhibits a small effect on mitochondrial metabolism. Therefore, the generation and maintenance of oxidative phosphorylation seems to be guaranteed. Despite that, the results reported in this study show for the first time that propofol *in vivo* could increase the susceptibility for MPTP opening induced by calcium. The induction of MPTP could collapse the transmembrane electrochemical gradient which ultimately could lead to the efflux of cytochrome *c* from the intermembrane space into the cytosol. This could lead to the activation of caspase pathway completing the mitochondrial-dependent pathway of apoptosis. Hence, a relevant question concerns whether the concentration of propofol is sufficiently high to influence mitochondrial pore transition opening in a decisive manner. So, further work will be important to establish the mechanism, regulation and consequences of MPTP opening triggered by the highest dose of propofol.

IV - Conclusão

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que a anestesia com propofol pode causar algumas alterações no metabolismo mitocondrial, no entanto, a fosforilação oxidativa não é afetada.

Este estudo demonstra pela primeira vez que o propofol, *in vivo*, tem a capacidade de modificar a suscetibilidade da abertura do MPTP nos ratos anestesiados com a dose mais elevada, levando a um eventual aumento de Ca^{2+} no citosol, o que poderá levar consequentemente a uma lesão celular dos hepatócitos dos ratos. Embora reversíveis, estas alterações poderão fazer com que o gradiente eletroquímico transmembranar entre em colapso e consequentemente conduzir a um efluxo de citocromo *c* do espaço intermembranar para o citosol. Isto poderá levar à ativação da via das caspases completando assim a via mitocondrial de indução de apoptose. Assim sendo, seria importante fazer um estudo complementar de modo a poder-se tirar uma conclusão concreta sobre o mecanismo de regulação e as consequências reais das alterações no MPTP resultantes da anestesia com a dose mais elevada de propofol. Uma das possibilidades seria avaliar se ocorre realmente apoptose, em tecido hepático dos ratos anestesiados com a dose mais elevada, usando a técnica de imuno-histoquímica com anticorpos específicos para proteínas apoptóticas.

As conclusões ao nível da atividade dos complexos mitocondriais são difíceis de racionalizar considerando apenas os resultados obtidos. Dado que os complexos enzimáticos envolvidos na fosforilação oxidativa são proteínas membranares, a sua atividade está dependente da organização dinâmica da bicamada lipídica. Assim, o aumento da atividade enzimática dos complexos I e II podem também resultar de alterações ao nível da organização dinâmica da membrana, incluindo alterações da fluidez membranar. As alterações na organização dinâmica da membrana poderão emergir: *i*) da acumulação na membrana do propofol, pois é uma molécula lipofílica; *ii*) de perturbações no normal metabolismo dos fosfolípidos (síntese, degradação ou remodelação), as quais conduzem a alterações da composição lipídica. A primeira hipótese pode ser avaliada por estudos *in vitro* com recurso a sondas fluorescentes de fluidez (e.g. DPH) incorporadas na membrana na ausência e na presença de diferentes concentrações de propofol. A segunda hipótese pode ser avaliada por estudos *in vivo/ex vivo*, analisando o perfil lipídico de mitocôndrias obtidas de animais controlo

e de animais tratados com diferentes doses de propofol por espectrometria de massa, após a sua extração com solventes orgânicos e separação por cromatografia em camada fina.

Este estudo demonstra que apesar das alterações observadas em algumas atividades das enzimas antioxidantes, os ratos anestesiados não sofrem stresse oxidativo, tendo em conta que a razão GSH/GSSG, um marcador do estado oxidativo da célula, não apresenta alterações entre os três grupos estudados.

V - Bibliografia

5. Bibliografia

- Aarts, L., van der Hee, R., Dekker, I., de Jong, J., Langemeijer, H., Bast, A., 1995. The widely used anesthetic agent propofol can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *Febs Lett* 357, 83-85.
- Acco, A., Comar, J.F., Bracht, A., 2004. Metabolic effects of propofol in the isolated perfused rat liver. *Basic Clin Pharmacol* 95, 166-174.
- Anand, K., Ramsay, M.A., Crippin, J.S., 2001. Hepatocellular injury following the administration of propofol. *Anesthesiology* 95, 1523-1524.
- Araki, K., Rifkind, J.M., 1981. The rate of osmotic hemolysis: a relationship with membrane bilayer fluidity. *Biochim Biophys Acta* 645, 81-90.
- Babbitt, P.C., 2000. Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10298-10300.
- Baker, M.T., Naguib, M., 2005. Propofol: the challenges of formulation. *Anesthesiology* 103, 860-876.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J.W., Mannervik, B., 1994. Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1480-1484.
- Bienert, A., Zaba, Z., Grzeskowiak, E., Kusza, K., Grabowski, T., 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol during propofol-alfentanil and propofol-remifentanil total intravenous anaesthesia monitored by spectral frequency index. *Med Sci Monit* 15, PI47-53.
- Boelsterli, U.A., Lim, P.L., 2007. Mitochondrial abnormalities--a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol* 220, 92-107.
- Branca, D., Roberti, M.S., Lorenzin, P., Vincenti, E., Scutari, G., 1991a. Influence of the anesthetic 2,6-diisopropylphenol on the oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 42, 87-90.
- Branca, D., Roberti, M.S., Vincenti, E., Scutari, G., 1991b. Uncoupling effect of the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol in isolated rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 290, 517-521.
- Branca, D., Vincenti, E., Scutari, G., 1995. Influence of the anesthetic 2,6-diisopropylphenol (propofol) on isolated rat heart mitochondria. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110, 41-45.
- Brodbelt, D., 2009. Perioperative mortality in small animal anaesthesia. *Vet J* 182, 152-161.
- Bryson, H.M., Fulton, B.R., Faulds, D., 1995. Propofol - an Update of Its Use in Anesthesia and Conscious Sedation. *Drugs* 50, 513-559.

- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Glutathione reductase levels in rat brain. *J Biol Chem* 250, 5375-5380.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 1994. *Biochemistry*, 2nd Ed. ed. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia.
- Chelikani, P., Ramana, T., Radhakrishnan, T.M., 2005. Catalase: A repertoire of unusual features. *Indian J of Clinical Bioch* 20, 131-135.
- Court, M.H., Duan, S.X., Hesse, L.M., Venkatakrishnan, K., Greenblatt, D.J., 2001. Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology* 94, 110-119.
- Cray, S.H., Robinson, B.H., Cox, P.N., 1998. Lactic acidemia and bradyarrhythmia in a child sedated with propofol. *Crit Care Med* 26, 2087-2092.
- De La Cruz, J.P., Villalobos, M.A., Seden, G., Sanchez De La Cuesta, F., 1998. Effect of propofol on oxidative stress in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. *Brain Res* 800, 136-144.
- Del Rio, L.A., Ortega, M.G., Lopez, A.L., Gorge, J.L., 1977. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Anal Biochem* 80, 409-415.
- Demiryurek, A.T., Cinel, I., Kahraman, S., Tecder-Unal, M., Gogus, N., Aypar, U., Kanzik, I., 1998. Propofol and intralipid interact with reactive oxygen species: a chemiluminescence study. *Br J Anaesth* 80, 649-654.
- Desai, V.G., Aidoo, A., Li, J., Lyn-Cook, L.E., Casciano, D.A., Feuers, R.J., 2000. Effects of bleomycin on liver antioxidant enzymes and the electron transport system from ad libitum-fed and dietary-restricted female and male Fischer 344 rats. *Nutr Cancer* 36, 42-51.
- Dyken, J.A., Will, Y., 2007. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discovery Today* 12, 777-785.
- Eriksson, O., 1991. Effects of the general anaesthetic Propofol on the Ca²⁺(+)-induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Febs Lett* 279, 45-48.
- Eriksson, O., Pollesello, P., Saris, N.E., 1992. Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anaesthetic propofol. *Biochem Pharmacol* 44, 391-393.
- Ernest, M.J., Kim, K.H., 1973. Regulation of rat liver glycogen synthetase. Reversible inactivation of glycogen synthetase D by sulfhydryl-disulfide exchange. *J Biol Chem* 248, 1550-1555.
- Fagerlund, M.J., Sjödin, J., Krupp, J., Dabrowski, M.A., 2010. Reduced effect of propofol at human $\alpha 1 \beta 2$ (N289M) $\gamma 2$ and $\alpha 2 \beta 3$ (N290M) $\gamma 2$ mutant GABA(A) receptors. *Brit J Anaesth* 104, 472-481.

- Fernandes, M.A., Custodio, J.B., Santos, M.S., Moreno, A.J., Vicente, J.A., 2006. Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion* 6, 176-185.
- Fodale, V., La Monaca, E., 2008. Propofol infusion syndrome - An overview of a perplexing disease. *Drug Safety* 31, 293-303.
- Franks, N.P., 2008. General anaesthesia: From molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9, 370-386.
- Gazzotti, P., Malmstrom, K., Crompton, M., 1997. Membrane Biochemistry, in: Carafoli, E., Semenza, G. (Eds.), *A laboratory manual on transport and bioenergetics* Springer-Verlag, New York, pp. 62-69.
- Glowaski, M.M., Wetmore, L.A., 1999. Propofol: application in veterinary sedation and anesthesia. *Clin Tech Small Anim Pract* 14, 1-9.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177, 751-766.
- Green, T.R., Bennett, S.R., Nelson, V.M., 1994. Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. *Toxicol Appl Pharmacol* 129, 163-169.
- Grimm, S., Brdiczka, D., 2007. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12, 841-855.
- Guitton, J., Buronfosse, T., Desage, M., Flinois, J.P., Perdrix, J.P., Brazier, J.L., Beaune, P., 1998. Possible involvement of multiple human cytochrome P450 isoforms in the liver metabolism of propofol. *Br J Anaesth* 80, 788-795.
- Gulcin, I., Alici, H.A., Cesur, M., 2005. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 53, 281-285.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130-7139.
- Hara, H., Kato, H., Kogure, K., 1990. Protective Effect of Alpha-Tocopherol on Ischemic Neuronal Damage in the Gerbil Hippocampus. *Brain Res* 510, 335-338.
- Haubenstricker, M.E., Holodnick, S.E., Mancy, K.H., Brabec, M.J., 1990. Rapid toxicity testing based on mitochondrial respiratory activity. *Bull Environ Contam Toxicol* 44, 675-680.
- Hillered, L., Siesjo, B.K., Arfors, K.E., 1984. Mitochondrial response to transient forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 438-446.
- Hissin, P.J., Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissue. *Anal Biochem* 74, 214-226.

- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, V., 1979. Membrane Potential of Mitochondria Measured With an Electrode Sensitive to Tetraphenylphosphonium and Relationship Between Proton Electrochemical Potential and Phosphorylation Potential in Steady State. *Journal Membrane Biology* 49, 105-121.
- Kaplowitz, N., 2002. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 22, 137-144.
- Kass, G.E.N., 2006. Mitochondrial involvement in drug-induced hepatic injury. *Chem-Biol Interact* 163, 145-159.
- Kim, Y.C., Miller, C.D., Anderson, A.J., 2000. Superoxide dismutase activity in *Pseudomonas putida* affects utilization of sugars and growth on root surfaces. *Appl Environ Microbiol* 66, 1460-1467.
- Kneiseler, G., Bachmann, H.S., Bechmann, L.P., Dechene, A., Heyer, T., Baba, H., Saner, F., Jochum, C., Gerken, G., Canbay, A., 2010. A Rare Case of Propofol-Induced Acute Liver Failure and Literature Review. *Case Rep Gastroenterol* 4, 57-65.
- Knobeloch, L.M., Blondin, G.A., Read, H.W., Harkin, J.M., 1990. Assessment of chemical toxicity using mammalian mitochondrial electron transport particles. *Arch Environ Contam Toxicol* 19, 828-835.
- Kotani, Y., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Hara, H., 2008. The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties. *CNS Neurosci Ther* 14, 95-106.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., Vercesi, A.E., 1996. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J Biol Chem* 271, 2929-2934.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26, 463-471.
- Kroemer, G., Susin, S.A., Zamzami, N., 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Bba-Bioenergetics* 1366, 151-165.
- Kuipers, J.A., Boer, F., Olieman, W., Burm, A.G., Bovill, J.G., 1999. First-pass lung uptake and pulmonary clearance of propofol: assessment with a recirculatory indocyanine green pharmacokinetic model. *Anesthesiology* 91, 1780-1787.
- Larijani, G.E., Gratz, I., Afshar, M., Jacobi, A.G., 1989. Clinical pharmacology of propofol: an intravenous anesthetic agent. *DICP* 23, 743-749.
- Luo, C., Long, J., Liu, J., 2008. An improved spectrophotometric method for a more specific and accurate assay of mitochondrial complex III activity. *Clin Chim Acta* 395, 38-41.

- Madeira, V.M.C., Antunesm.Mc, Carvalho, A.P., 1974. Activation-Energies of Atpase Activity of Sarcoplasmic-Reticulum. *Biochem Bioph Res Co* 58, 897-904.
- Manataki, A.D., Tselepis, A.D., Glantzounis, G.K., Arnaoutoglou, H.M., Tsimoyiannis, E.C., Stavropoulos, N.E., 2001. Lipid peroxidation and the use of emulsified propofol in laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 15, 950-953.
- Marik, P.E., 2004. Propofol: Therapeutic indications and side-effects. *Curr Pharm Design* 10, 3639-3649.
- McNeir, D.A., Mainous, E.G., Trieger, N., 1988. Propofol as an intravenous agent in general anesthesia and conscious sedation. *Anesth Prog* 35, 147-151.
- Mirenda, J., Broyles, G., 1995. Propofol as used for sedation in the ICU. *Chest* 108, 539-548.
- Moreno, A.J., Oliveira, P.J., Nova, C.D., Alvaro, A.R., Moreira, R.A., Santos, S.M., Macedo, T., 2007. Unaltered hepatic oxidative phosphorylation and mitochondrial permeability transition in wistar rats treated with nimesulide: Relevance for nimesulide toxicity characterization. *J Biochem Mol Toxicol* 21, 53-61.
- Mouithys-Mickalad, A., Hans, P., Deby-Dupont, G., Hoebeke, M., Deby, C., Lamy, M., 1998. Propofol reacts with peroxynitrite to form a phenoxyl radical: demonstration by electron spin resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 833-837.
- Muravchick, S., Levy, R.J., 2006. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 105, 819-837.
- Murayama, T., Sato, Y., Wainai, T., Enomoto, A., Seo, N., Yoshino, H., Kobayashi, E., 2005. Effect of continuous infusion of propofol on its concentration in blood with and without the liver in pigs. *Transplant Proc* 37, 4567-4570.
- Murphy, P.G., Atkinson, R., Columb, M.O., Myers, D.S., Day, P., 1992a. Effect of propofol and thiopentone on free radical-induced haemolysis. *Br J Anaesth* 69, 532-533.
- Murphy, P.G., Bennett, J.R., Myers, D.S., Davies, M.J., Jones, J.G., 1993. The Effect of Propofol Anesthesia on Free Radical-Induced Lipid-Peroxidation in Rat-Liver Microsomes. *Eur J Anaesth* 10, 261-266.
- Murphy, P.G., Myers, D.S., Davies, M.J., Webster, N.R., Jones, J.G., 1992b. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth* 68, 613-618.
- Musacchio, E., Rizzoli, V., Bianchi, M., Bindoli, A., Galzigna, L., 1991. Antioxidant action of propofol on liver microsomes, mitochondria and brain synaptosomes in the rat. *Pharmacol Toxicol* 69, 75-77.

- Navapurkar, V.U., Skepper, J.N., Jones, J.G., Menon, D.K., 1998. Propofol preserves the viability of isolated rat hepatocyte suspensions under an oxidant stress. *Anesth Analg* 87, 1152-1157.
- Nieminen, A.L., Saylor, A.K., Tesfai, S.A., Herman, B., Lemasters, J.J., 1995. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 307 (Pt 1), 99-106.
- Nohl, H., Hegner, D., 1978. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem* 82, 563-567.
- Nordberg, J., Arner, E.S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31, 1287-1312.
- Nouette-Gaulain, K., Quinart, A., Letellier, T., Sztark, F., 2007. Mitochondria in anaesthesia and intensive care. *Ann Fr Anesth* 26, 319-333.
- Oda, Y., Hamaoka, N., Hiroi, T., Imaoka, S., Hase, I., Tanaka, K., Funae, Y., Ishizaki, T., Asada, A., 2001. Involvement of human liver cytochrome P450B6 in the metabolism of propofol. *Br J Clin Pharmacol* 51, 281-285.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 44, 276-278.
- Ozturk, E., Demirbilek, S., Koroglu, A., But, A., Begec, Z.O., Gulec, M., Akyol, O., Ersoy, M.O., 2008. Propofol and erythropoietin antioxidant properties in rat brain injured tissue. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 81-86.
- Paya, M., Halliwell, B., Hoult, J.R., 1992. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 44, 205-214.
- Pereira, C.V., Moreira, A.C., Pereira, S.P., Machado, N.G., Carvalho, F.S., Sardao, V.A., Oliveira, P.J., 2009. Investigating drug-induced mitochondrial toxicity: a biosensor to increase drug safety? *Curr Drug Saf* 4, 34-54.
- Rajdev, S., Reynolds, I.J., 1993. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca^{2+} concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neurosci Lett* 162, 149-152.
- Raoof, A.A., Augustijns, P.F., Verbeeck, R.K., 1996. In vivo assessment of intestinal, hepatic, and pulmonary first pass metabolism of propofol in the rat. *Pharmaceut Res* 13, 891-895.
- Rigoulet, M., Devin, A., Averet, N., Vandais, B., Guerin, B., 1996. Mechanisms of inhibition and uncoupling of respiration in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol. *Eur J Biochem* 241, 280-285.

- Rison, R.A., Ko, D.Y., 2009. Isolated fatty liver from prolonged propofol use in a pediatric patient with refractory status epilepticus. *Clin Neurol Neurosurg* 111, 558-561.
- Scatena, R., Bottoni, P., Botta, G., Martorana, G.E., Giardina, B., 2007. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C12-21.
- Schwieler, L., Delbro, D.S., Engberg, G., Erhardt, S., 2003. The anaesthetic agent propofol interacts with GABA(B)-receptors: an electrophysiological study in rat. *Life Sci* 72, 2793-2801.
- Sneyd, J.R., 2004. Recent advances in intravenous anaesthesia. *Br J Anaesth* 93, 725-736.
- Stevanato, R., Momo, F., Marian, M., Rigobello, M.P., Bindoli, A., Bragadin, M., Vincenti, E., Scutari, G., 2001. Combined effect of propofol and GSNO on oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria. *Nitric Oxide-Biol Ch* 5, 158-165.
- Sutherland, L., Ebner, T., Burchell, B., 1993. The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem Pharmacol* 45, 295-301.
- Szewczyk, A., Wojtczak, L., 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54, 101-127.
- Sztark, F., Ichas, F., Ouhabi, R., Dabadie, P., Mazat, J.P., 1995. Effects of the Anesthetic Propofol on the Calcium-Induced Permeability Transition of Rat-Heart Mitochondria - Direct Pore Inhibition and Shift of the Gating Potential. *Febs Lett* 368, 101-104.
- Tanelian, D.L., Kosek, P., Mody, I., MacIver, M.B., 1993. The role of the GABAA receptor/chloride channel complex in anesthesia. *Anesthesiology* 78, 757-776.
- Tang, J., Chen, L., White, P.F., Watcha, M.F., Wender, R.H., Naruse, R., Kariger, R., Sloninsky, A., 1999. Recovery profile, costs, and patient satisfaction with propofol and sevoflurane for fast-track office-based anesthesia. *Anesthesiology* 91, 253-261.
- Thomas, C.E., Aust, S.D., 1985. Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1, 293-300.
- Tsuchiya, M., Asada, A., Arita, K., Utsumi, T., Yoshida, T., Sato, E.F., Utsumi, K., Inoue, M., 2002. Induction and mechanism of apoptotic cell death by propofol in HL-60 cells. *Acta Anaesthesiol Scand* 46, 1068-1074.
- Tsuchiya, M., Kagan, V.E., Freisleben, H.J., Manabe, M., Packer, L., 1994. Antioxidant activity of alpha-tocopherol, beta-carotene, and ubiquinol in membranes: cis-parinaric acid-incorporated liposomes. *Methods Enzymol* 234, 371-383.

- Tsuchiya, M., Scita, G., Freisleben, H.J., Kagan, V.E., Packer, L., 1992. Antioxidant radical-scavenging activity of carotenoids and retinoids compared to alpha-tocopherol. *Methods Enzymol* 213, 460-472.
- Vasile, B., Rasulo, F., Candiani, A., Latronico, N., 2003. The pathophysiology of propofol infusion syndrome: a simple name for a complex syndrome. *Intensive Care Med* 29, 1417-1425.
- Wallace, K.B., 2008. Mitochondrial off targets of drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 29, 361-366.
- White, P.F., 2008. Propofol: its role in changing the practice of anesthesia. *Anesthesiology* 109, 1132-1136.
- Winterbourn, C.C., Stern, A., 1987. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest* 80, 1486-1491.
- Yamaguchi, S., Hamaguchi, S., Mishio, M., Okuda, Y., Kitajima, T., 2000. Propofol prevents lipid peroxidation following transient forebrain ischemia in gerbils. *Can J Anaesth* 47, 1025-1030.
- Yamakura, T., Sakimura, K., Shimoji, K., 1999. Direct inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by high concentrations of opioids. *Anesthesiology* 91, 1053-1063.
- Yamazaki, H., Shimizu, M., Nagashima, T., Minoshima, M., Murayama, N., 2006. Rat cytochrome P450 2C11 in liver microsomes involved in oxidation of anesthetic agent propofol and deactivated by prior treatment with propofol. *Drug Metab Dispos* 34, 1803-1805.
- Young, L.C., Conn, E.E., 1956. The Reduction and Oxidation of Glutathione by Plant Mitochondria. *Plant Physiol* 31, 205-211.
- Ypsilantis, P., Mikroulis, D., Politou, M., Tsoukali, H., Pitiakoudis, M., Didilis, V., Theodoridis, G., Bougioukas, G., Simopoulos, C., 2006. Tolerance to propofol's sedative effect in mechanically ventilated Rabbits. *Anesth Analg* 103, 359-365, table of contents.
- Zeng, Y., Shao, H., Li, J., Zhou, Y., Ge, Z., Fan, J., Shao, Z., 2008. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: role of cardiolipin. *Brit J Pharmacol* 153, 1641-1649.
- Zimmerman, H.J., 2000. Drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis* 4, 73-96, vi.