

CARLOS HENRIQUE MARQUES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PÓS-CONDICIONAMENTO
ISQUÊMICO NA PREVENÇÃO DAS LESÕES DE REPERFUSÃO MESENTÉRICA**

CAMPO GRANDE

2016

CARLOS HENRIQUE MARQUES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PÓS-CONDICIONAMENTO
ISQUÊMICO NA PREVENÇÃO DAS LESÕES DE REPERFUSÃO MESENTÉRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos.

CAMPO GRANDE

2016

Dedico esta tese

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que tem contribuído grandemente na formação de profissionais e com o progresso de nosso estado.

Aos meus pais, Bento e Irene, pela dedicação e apoio na realização de cada sonho.

A Marta, minha esposa, por ser verdadeiramente companheira em todos os momentos de minha vida.

Aos meus filhos, Gabriel e Rodrigo, por trazerem tanta alegria à minha vida e por serem os grandes motivos que me fazem querer evoluir.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, mestre e amigo, pelos grandes ensinamentos e pelo tempo dedicado na orientação desta tese.

À Profa. Dra. Luciana Nakao Odashiro Miji, pela dedicação na análise histológica das peças.

Ao colega Ed Nogueira Neto, pela dedicação e apoio na realização do trabalho experimental.

Ao amigo Prof. Pedro Carvalho Cassino, médico veterinário, pelo auxílio na parte experimental.

Às acadêmicas de medicina Isadora Ishaq Alves, Milena Garcia e Nádia Meneguesso Calheiros, pelo auxílio na parte experimental.

Ao Prof. Anderson Fernandes da Silva, pelo auxílio no preparo e análise das peças.

Às Profas. Dras. Telma Bazzano da Silva Carvalho, Bióloga e Chefe do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Maria Araújo Teixeira, Médica Veterinária Responsável Técnica do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela excelência na condução do Biotério, possibilitando a realização da etapa experimental desta pesquisa.

“Somos aquilo que fazemos repetidas vezes. A virtude, portanto, não é um dom,
mas sim um hábito.”

Demóstenes

SANTOS, CHM. Avaliação de diferentes métodos de pós-condicionamento isquêmico na prevenção das lesões de reperfusão mesentérica. Campo Grande, 2016. [Tese – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

RESUMO

O pós-condicionamento isquêmico tem sido reconhecido como eficaz na prevenção das lesões de reperfusão em situações de isquemia e reperfusão em vários órgãos e tecidos. Entretanto, não está ainda claro qual seria a melhor maneira de realizá-lo, já que as publicações mostram grande variação de método no seu emprego. O objetivo geral da pesquisa foi avaliar o efeito de dois diferentes métodos de pós-condicionamento isquêmico no processo de isquemia e reperfusão mesentérica em ratos; os objetivos específicos foram avaliar a eficácia do pós-condicionamento isquêmico na proteção local no processo de isquemia e reperfusão mesentérica em ratos (intestino), além de sua eficácia na prevenção de lesões de reperfusão remota nos pulmões e fígado. Foram estudados 30 ratos Wistar, distribuídos em três grupos: grupo A (10 ratos), em que se realizou isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos) mesentérica; grupo B (10 ratos), isquemia e reperfusão, intercalados pelo pós-condicionamento isquêmico com dois ciclos alternados de reperfusão e reoclusão, de dois minutos cada; e grupo C (10 ratos), isquemia e reperfusão, intercalados pelo pós-condicionamento isquêmico com quatro ciclos alternados de reperfusão e reoclusão, de 30 segundos cada. Ao final, ressecou-se um segmento do intestino delgado, 5cm proximalmente à válvula ileocecal, o lobo lateral esquerdo do fígado e o lobo caudal do pulmão direito para análise histológica. Avaliou-se os resultados pela classificação de Chiu *et al.* (1970) para o intestino, Takeda *et al.* (2003) para o fígado e Sizlan *et al.* (2009) para pulmão. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, estabelecendo-se nível de significância de $p < 0,05$. Para tal utilizou-se o programa Bioestat 5.0. A análise intestinal demonstrou médias 2,8 no grupo A, 1,4 no grupo B e 1,4 no grupo C ($p < 0,05$ entre grupos A e B; A e C; $p > 0,05$ entre grupos B e C); em relação ao fígado, obteve-se médias 1,8 no grupo A, 1,7 no grupo B e 1,3 no grupo C ($p > 0,05$); na análise do pulmão obteve-se média de lesão tecidual um para os três grupos ($p > 0,05$). O pós-condicionamento isquêmico foi capaz de diminuir a lesão diretamente produzida sobre o intestino, tanto com dois ciclos de dois minutos quanto com quatro ciclos de 30 segundos, porém, não foi capaz de diminuir as lesões à distância no fígado dos animais submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica. Não foi possível avaliar-se a eficácia do pós-condicionamento isquêmico nos pulmões uma vez que o método aqui utilizado causou lesão leve neste órgão.

Palavras-chave: Isquemia. Traumatismo por reperfusão. Intestino delgado. Pulmão. Fígado. Ratos.

SANTOS, CHM. Evaluation of different methods of ischemic postconditioning preventing mesenteric reperfusion injury. Campo Grande, 2016. [Thesis - Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region of the Federal University of Mato Grosso do Sul].

ABSTRACT

Ischemic postconditioning have been recognized as effective in preventing reperfusion injury in situations of ischemia and reperfusion in various organs and tissues. However, it is not clear what would be the best way to accomplish it, since studies show wide variation method. The overall objective of this research was to evaluate the effect of two different methods of ischemic postconditioning in the process of mesenteric ischemia and reperfusion in rats; the specific objectives were to evaluate the effectiveness of ischemic postconditioning on local protection (intestine) in the process of mesenteric ischemia and reperfusion in rats, in addition to its efficacy in preventing remote reperfusion injury in the lungs and liver. Thirty Wistar rats were distributed into three groups: group A (10 rats), which was held mesenteric ischemia (30 minutes) and reperfusion (60 minutes); group B (10 rats), ischemia and reperfusion, interspersed by ischemic postconditioning with two alternating cycles of reperfusion and reocclusion, two minutes each; and Group C (10 rats), ischemia-reperfusion process interleaved by postconditioning by four alternating cycles of reperfusion and reocclusion of 30 seconds each. Finally, it was resected a segment of small intestine, 5cm proximal to the ileocecal valve, the left lateral lobe of the liver and caudal lobe of the right lung for histological analysis. We evaluated the results by Chiu *et al.* (1970) to the intestine, Takeda *et al.* (2003) to the liver and Sizlan *et al.* (2009) to the lung. The results were analyzed statistically using the nonparametric Kruskal-Wallis test, establishing a significance level of $p < 0.05$. For this we used the program Bioestat 5.0. The analysis of the small bowel showed 2.8 in group A, 1.4 in group B and 1.4 in group C ($p < 0.05$ between groups A and B; A and C; $p > 0.05$ between groups B and C); in relation to the liver, there was obtained 1.8 average in group A, 1.7 in B, and 1.3 in group C ($p > 0.05$); the average of tissue damage on lungs was one to three groups ($p > 0.05$). The ischemic postconditioning was able to reduce the harm produced directly on the intestine, both with two cycles of two minutes and with four cycles of 30 seconds, however, it was unable to decrease injuries on liver in the animals subjected to mesenteric ischemia and reperfusion process. The research was unable to evaluate the efficacy of ischemic postconditioning on lungs, since the method of ischemia and reperfusion caused only mild injury in all groups.

Key-words: Ischemia. Reperfusion injury. Intestine, small. Lung. Liver. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Demonstração esquemática dos períodos de isquemia e reperfusão nos grupos A, B e C.....	33
Figura 2 -	Fotografia demonstrando a etapa de dissecação da artéria mesentérica cranial (1); intestino delgado (2); fígado (3).....	34
Figura 3 -	Fotografia demonstrando a aplicação do clampe vascular na artéria mesentérica cranial (1); intestino delgado (2); fígado (3).....	35
Figura 4 -	Fotografia dos espécimes ressecados para estudo histológico. (1) intestino delgado; (2) fígado; (3) pulmão.....	36
Figura 5 -	Fotografia do aspecto macroscópico do intestino delgado e ceco dos animais após a fase de reperfusão; A: grupo I/R; B: grupo PoCI-1.	41
Figura 6 -	Fotomicrografias demonstrando os graus de lesão intestinal de acordo com a classificação de Chiu <i>et al.</i> (1970). A: grau 1 – setas: espaço subepitelial de Grunhagen; B: grau 2 – seta 1: formação do espaço subepitelial de Grunhagen; setas 2: espaçamento aumentado entre as vilosidades; C: grau 3 – seta 1: túnica muscular; seta 2: lâmina própria; setas 3: destruição da porção livre das vilosidades; setas 4: capilares dilatados; D: grau 4 – setas 1: destruição estrutural das vilosidades; setas 2: material necrótico; seta 3: hemorragia e ulceração glandular basal (microscopia óptica 100X – coloração hematoxilina-eosina).....	42
Figura 7 -	Fotomicrografias demonstrando os graus de lesão hepática de acordo com a classificação de Takeda <i>et al.</i> (2003). A: grau 1 – seta: congestão da veia centrolobular; B: grau 2 – 1: congestão da veia centrolobular; setas 2: degeneração parcial dos hepatócitos; C: grau 3 – seta 1: congestão centrolobular; seta 2: degeneração portal dos hepatócitos; D: grau 3 – setas: degeneração portal dos hepatócitos com necrose (A, B e C – microscopia óptica 100X; D – microscopia óptica 400X – coloração hematoxilina-eosina).....	43
Figura 8 -	Fotomicrografia demonstrando lesão pulmonar grau 1 da classificação de Sizlan <i>et al.</i> (2009). Setas: infiltrado neutrofílico (microscopia óptica 400X – coloração hematoxilina-eosina).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias dos graus de lesão intestinal nos animais estudados.....	39
Tabela 2 - Médias dos graus de lesão hepática nos animais estudados.....	39
Tabela 3 - Médias dos graus de lesão pulmonar nos animais estudados.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aminotransferase de aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribobucleico)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERTO	Espécies reativas tóxicas do oxigênio
g	Gramma
IL	Interleucina
I/R	Isquemia e reperfusão
µm	Micrômetro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
n	Tamanho da amostra
PoCI	Pós-condicionamento isquêmico
PrCI	Pré-condicionamento isquêmico
R/I	Reperfusão e isquemia
RL	Radicais livres
RLO	Radicais livres de oxigênio
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
'	Minuto(s)
”	Segundo(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Histórico	15
2.2	Fisiopatologia	17
2.2.1	<u>Isquemia</u>	17
2.2.2	<u>Radicais livres</u>	18
2.2.3	<u>Reperusão</u>	19
2.3	Espécies reativas tóxicas de oxigênio e pré-condicionamento isquêmico	20
2.4	Tratamento farmacológico da Síndrome de isquemia e reperusão	23
2.5	Pós-condicionamento isquêmico	25
2.6	Efeito do pós-condicionamento isquêmico na lesão de reperusão à distância	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MÉTODO	32
4.1	Aprovação pelo Comitê de Ética	32
4.2	Animais estudados	32
4.3	Grupos constituídos	32
4.4	Anestesia	33
4.5	Procedimento cirúrgico	33
4.6	Estudo histopatológico	36
4.7	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	39
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

Isquemia e reperfusão (I/R), e, mais recentemente, lesão de reperfusão, são temas amplamente estudados, de maneira muito mais intensa a partir da década de oitenta. Ao tempo em que redigimos este texto, pesquisando no portal científico pubmed.gov os descritores “*ischemia AND reperfusion*”, encontram-se 54633 artigos. Com a pesquisa “*reperfusion injury*”, 49682 resultados. Então, por que ainda precisamos investigar sobre este tema? Porque apesar da grande quantidade de publicações e dos indiscutíveis avanços no conhecimento da fisiopatologia do processo e da comprovação de métodos capazes de minimizar seus efeitos lesivos, ainda existem questionamentos sem resposta. Isto faz do seu estudo um grande desafio, e cada nova publicação contribui um pouco mais na construção do conhecimento deste complexo assunto.

A lesão de reperfusão ocorre em diversas situações, envolvendo vários órgãos e tecidos, apresentando, entretanto, aspectos até certo ponto comuns a todas elas. No que se refere à isquemia mesentérica, pode ocorrer de modo abrupto e extenso ou insidiosamente e comprometendo pequenos segmentos intestinais, dependendo do tipo de oclusão vascular e do nível em que esta ocorre. Independente da forma de apresentação, a isquemia mesentérica sempre foi de difícil manejo, tanto no diagnóstico quanto no tratamento.

O quadro clínico é inespecífico, o que exige do médico assistente a perspicácia de pensar nesta possibilidade para que realize os exames complementares necessários o mais breve possível, já que o tempo é primordial para a evolução do paciente. Resolvida a questão do diagnóstico, surge o próximo desafio: o tratamento. Quando a isquemia já ocorreu há muitas horas e é irreversível, não resta muita dúvida sobre o que deve ser feito, ou seja, a ressecção dos segmentos intestinais comprometidos. Isto pode muitas vezes levar a uma situação incompatível com a vida, quando todo o intestino delgado e grosso são removidos. Situação mais complexa, no entanto, é quando se acredita ser possível realizar um tratamento de desobstrução do vaso ocluído, por dois motivos principais. Primeiro, porque esta definição é empírica, baseada em exames que não são exatos e na experiência do médico, podendo acontecer de realizar-se a revascularização num intestino que não mais era viável. Segundo, porque quando a indicação está correta, a reperfusão, embora seja etapa fundamental na resolução do problema,

dará início a uma sequência de eventos danosos aos tecidos comprometidos, muitas vezes mais agressivos do que a própria isquemia. Além disso, os produtos da reperfusão não agem exclusivamente no órgão alvo da isquemia, mas sim sistemicamente, comprometendo vários órgãos distantes, o que compromete muito as funções orgânicas do indivíduo que até aquele momento já estava em más condições clínicas e pode agora evoluir com piora progressiva, chegando muitas vezes ao óbito.

Quando se avalia de forma genérica os avanços terapêuticos desenvolvidos para atenuar as lesões de reperfusão, o maior destaque deve-se à descrição em 1986 do pré-condicionamento isquêmico (PrCI) por Murry *et al.* Os autores demonstraram que a realização de pequenos ciclos de I/R, precedendo a I/R prolongadas, diminuía a área de infarto no coração de cães. Esta publicação teve enorme impacto no meio científico e originou inúmeras pesquisas semelhantes em animais e humanos, tanto na I/R miocárdica quanto em vários outros órgãos, inclusive o intestino. Entretanto, embora este método tenha sido comprovado como eficaz e incorporado na prática clínica em alguns centros, quando, por exemplo, um paciente é submetido a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea, para a isquemia mesentérica sua aplicabilidade é quase nula, uma vez que geralmente ao se fazer o diagnóstico a isquemia já está instalada.

Portanto, especificamente na I/R intestinal, a contribuição científica de maior relevância surgiu em 2003 com o estudo de Zhao *et al.* apresentando o conceito do pós-condicionamento isquêmico (PoCI). Este método consiste na realização de ciclos curtos de reperfusão e isquemia (R/I), logo após a isquemia e precedendo a reperfusão propriamente dita. Esta terapêutica foi eficaz em minimizar as lesões de isquemia miocárdica em cães e, posteriormente, foi também demonstrada em vários outros órgãos e em diferentes animais.

Este método apresenta-se promissor porque se comprovada sua eficácia em seres humanos, teoricamente seria aplicável na I/R mesentérica. Isto fez com que muitos pesquisadores concentrassem seus estudos nesta nova modalidade terapêutica. Como dito, a análise inicial foi animadora, porque a maioria das pesquisas comprovou a diminuição da lesão tecidual com seu emprego. Posteriormente, algumas publicações surgiram analisando sua eficácia à distância, já que os conhecimentos da fisiopatologia do processo mostram que não adianta um

bom resultado local, se os produtos da lesão de reperfusão comprometerem outros órgãos remotamente.

A quase totalidade dos estudos envolvendo o PoCI no tratamento da I/R mesentérica tem mostrado sua eficácia, em maior ou menor proporção. Porém, alguns não obtiveram os mesmos achados, não comprovando sua capacidade de minimizar as lesões de reperfusão. Estas diferenças de resultados podem estar relacionadas ao método de sua utilização, já que o número de ciclos e a duração dos mesmos é bastante variável nos estudos até aqui publicados. Isto demonstra a necessidade de se aprofundarem as pesquisas na tentativa de apresentar qual a duração dos ciclos do PoCI e qual a quantidade destes ciclos que oferece melhor resultado na prevenção ou diminuição das lesões de reperfusão.

Dentre os órgãos que sofrem lesão de reperfusão remota, o pulmão é um dos mais estudados, por ser envolvido na cascata de eventos lesivos da reperfusão, e por ter implicação direta na má evolução e óbito dos pacientes que apresentam tal afecção. Todo o sangue venoso intestinal é drenado para o fígado pela veia porta, o que implica em ser este o primeiro órgão a receber as substâncias maléficas formadas na reperfusão intestinal. Assim, considerando o exposto e a falta de estudos neste sentido, qual seja, a avaliação da lesão remota pulmonar e hepática no processo de I/R mesentérica, torna-se de grande relevância a realização desta pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Os filósofos gregos da escola de Pitágoras haviam imaginado o universo formado por quatro elementos: terra, ar, fogo e água, dotados de quatro qualidades, opostas aos pares: quente e frio, seco e úmido. A transposição da estrutura quaternária universal para o campo da biologia deu origem à concepção dos quatro humores do corpo humano (REZENDE, 2009).

Na escola hipocrática, o conceito de humor era de uma substância existente no organismo, necessária à manutenção da vida e da saúde. Os humores eram o sangue, a fleuma, a bile e a água. Segundo a doutrina dos quatro humores, o sangue era armazenado no fígado e levado ao coração, onde se aquecia, sendo considerado quente e úmido. Acreditava-se na época que o equilíbrio dos humores era a solução para o restabelecimento da saúde e a atuação do médico seria auxiliar a natureza na restauração deste equilíbrio. Se estivesse frio e seco, dever-se-ia tornar quente e úmido (REZENDE, 2009).

De certa forma, em relação à isquemia, apesar dos grandes avanços da medicina durante mais de dois mil e quatrocentos anos dos postulados de Hipócrates, até pouco tempo atrás acreditava-se que corrigi-la simplesmente restabelecendo-se o fluxo sanguíneo seria suficiente para curar o enfermo.

Boley, Brandt e Sammartano (1997) publicaram que o primeiro a relatar a isquemia mesentérica foi Antonio Benivieni, no final do século XV, e que somente no século XIX foi que este assunto despertou o interesse da comunidade médica com os relatos de Hodgson em 1815, Tiedman em 1843 e Virchow em 1847. Em 1895, Elliot relatou o primeiro caso de um paciente que sobreviveu ao tratamento da isquemia mesentérica. Elliot ressecou o segmento que apresentava gangrena e realizou dois estomas, reconstruindo o trânsito intestinal posteriormente. Esta abordagem realizada há mais de um século é ainda utilizada em muitos pacientes nos dias de hoje.

Apesar de vários relatos de casos de isquemia mesentérica na primeira metade do século XX, pouco se alterou neste período quanto ao método diagnóstico (laparotomia) ou tratamento (ressecção do segmento intestinal comprometido). Segundo Boley, Brandt e Sammartano (1997), o pessimismo da época frente a

isquemia mesentérica ficou bem demonstrado na clássica frase de Cokkinis: “A oclusão dos vasos mesentéricos é uma daquelas condições em que o diagnóstico é impossível, o prognóstico desesperador e o tratamento quase inútil.”

Em 1951, Klass introduziu os conceitos de que seria necessário restabelecer o fluxo sanguíneo para o intestino isquêmico, mas viável, e da importância de se realizar o diagnóstico antes que a necrose estivesse estabelecida. Ele então tratou um paciente com a realização de embolectomia da artéria mesentérica superior, não considerando necessária a ressecção intestinal. Embora o paciente tenha morrido após alguns dias, a necropsia revelou intestino normal. Klass observou: “Embora os sinais físicos fossem pobres ou talvez totalmente ausentes, a história era clara e definitiva. A dor dramática e súbita no abdômen médio que faz um homem parar suas atividades, que o faz transpirar e sentir-se lânguido, e em seguida apresentar diarreia sanguinolenta, esta sequência de eventos... isto indica laparotomia de urgência”.

Em 1958, Shaw e Maynard III realizaram a primeira tromboendarterectomia para tratamento da isquemia mesentérica aguda. Apesar destes avanços, até o final da década de 60 a mortalidade por isquemia mesentérica era de 70% a 90%, devendo-se à demora no diagnóstico e tratamento estes elevados índices.

Sem dúvida um grande avanço na história da isquemia mesentérica foi a descoberta de um método diagnóstico que até hoje é considerado o “padrão-ouro”, a angiografia, descrita em 1966 por Aakhus. Posteriormente, este método passou a ser utilizado também como apoio terapêutico pela injeção de papaverina em casos de isquemia arterial não-oclusiva.

Embora a angiografia tenha facilitado o diagnóstico e tornado possível o tratamento imediato de alguns casos, e, conseqüentemente, diminuído os índices de mortalidade, até então pouco se evoluíra em relação ao tratamento: ressecar quando houvesse necrose e restabelecer o fluxo sanguíneo quando o intestino estivesse viável.

Em 1986, com a publicação de Parks e Granger (1986a), surge então uma informação capaz de mudar os conceitos vigentes até então e mostrar um novo caminho a ser pesquisado na abordagem da isquemia, não só mesentérica, mas do que viria a ser chamado Síndrome de Isquemia e Reperfusão (MENON *et al.*, 2005). Estes autores demonstraram que a reperfusão é mais lesiva do que a isquemia isoladamente. O que na época parecia um paradoxo, ser prejudicial reoxigenar um

órgão ou tecido em sofrimento isquêmico, foi confirmado por inúmeros outros estudos que elucidaram a fisiopatologia do processo de I/R.

2.2 Fisiopatologia

2.2.1 Isquemia

A isquemia leva a uma série de alterações no nível celular que podem culminar com a morte das células. A ausência de oxigênio impede a fosforilação oxidativa na mitocôndria, que é a via mais eficiente de produção de energia. Com isto, a glicólise anaeróbia torna-se o meio de obtenção de energia, e, sendo menos eficiente, não é adequada para a reposição do trifosfato de adenosina (ATP) consumido. A diminuição de ATP prejudica o transporte ativo de íons através da membrana, levando a um acúmulo de sódio e água no interior da célula, com consequente edema (PARKS; GRANGER, 1986b).

A isquemia determina ainda um aumento da permeabilidade ao cálcio, promovendo sua entrada na célula. O aumento do cálcio intracelular, potencializado pela diminuição de seu transporte ativo para o meio extracelular, dependente de ATP, apresenta vários efeitos deletérios: alteração da forma da célula por contração de seu esqueleto; ativação de fosfolipases, com consequente liberação de metabólitos do ácido aracdônico a partir da membrana celular e das organelas e produção de radicais livres (CARDEN; GRANGER, 2000).

As células endoteliais e os leucócitos, elementos fundamentais na lesão de reperfusão, são afetados já na isquemia, sofrendo alterações que se intensificarão na reperfusão. Quando expostas à hipóxia, as células endoteliais alteram seu citoesqueleto e suas formas, gerando pequenos poros intercelulares e determinando um aumento da permeabilidade endotelial, podendo levar à formação de edema tecidual (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005).

A degradação dos estoques de ATP para a produção de energia durante a isquemia leva a uma elevação da concentração de monofosfato de adenosina (AMP). Este é catabolizado em adenosina, inosina, e então, hipoxantina. A hipoxantina serve como um substrato purino oxidável para a xantina-desidrogenase ou oxidase, e, paralelamente, há a conversão de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase. Esta conversão se faz de maneira irreversível, por meio de proteases

ativadas pelo cálcio, ou de maneira reversível, pela oxidação de grupos sulfidríla. Assim, durante a isquemia temos a formação principalmente de hipoxantina e xantina-oxidase, que têm papel fundamental durante a reperfusão desencadeando o processo de formação dos radicais livres (HANGLUND; BULKLEY; GRANGER, 1987; PARKS; GRANGER, 1986b; SCHANAIDER; PERROTTA; MADI, 1991).

2.2.2 Radicais livres

Os radicais livres (RL) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005).

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Os RL são liberados durante a produção de energia, estão envolvidos com a fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. No entanto, em excesso, apresentam efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação, agressão às proteínas e ao DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Conforme Schneider e Oliveira (2004), o oxigênio que respiramos é metabolizado em nosso organismo da seguinte maneira: aproximadamente 85% a 90% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e os 10% a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação direta. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao oxigênio para formar água (em torno de 95% a 98% dos 85% a 90%

citados acima). Os dois a cinco por cento restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO).

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das ERO (em inglês, ROS: “*Reactive Oxygen Species*”) é produzida na cadeia respiratória mitocondrial, onde 95% a 98% do oxigênio consumido é reduzido à água e o restante utilizado na formação de ERO. A molécula de oxigênio pode aceitar um total de quatro elétrons para ser reduzida a duas moléculas de água, mas pode, também, ser reduzida por um elétron por vez, levando à produção de ERO (CARDOZO, 2008).

O termo “Espécies Reativas de Oxigênio” inclui além dos RLO (como o radical superóxido e o radical hidroxila), espécies não-radicais como, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mensageiro secundário na transdução de sinal intra e extracelular, o ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante produzido por neutrófilos e o oxigênio singlete, uma forma altamente reativa do oxigênio (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

2.2.3 Reperusão

Os RLO implicados na lesão de reperusão são: ânion superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O peróxido de hidrogênio não se constitui em um radical, pois não apresenta elétron livre em sua órbita. Desta forma, a maneira mais correta de se referir a essas substâncias é denominando-as espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) (HALLIWELL, 1991).

A xantina-oxidase depende do oxigênio para a metabolização da hipoxantina em xantina e radical superóxido. A enzima superóxido-dismutase catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Na presença de íons ferro ou cobre pode haver a conversão do peróxido de hidrogênio em radical hidroxila (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005; HALLIWELL, 1991).

As ERTO podem lesar qualquer componente bioquímico da célula, mas os lipídeos, proteínas (tanto estruturais quanto enzimáticas) e ácidos nucleicos são seus principais alvos. Como apresentam grande reatividade, as ERTO interagem com as primeiras estruturas que encontram, em geral os fosfolípidos da membrana celular ou das membranas das organelas. A reação das ERTO com os ácidos

graxos poliinsaturados da membrana celular leva à formação de vários radicais lipídicos (peróxidos lipídicos, hidroperoxidolipídicos, conjugados dienos e malondialdeído), em uma cadeia de reações que culmina com a disfunção da membrana e lise celular. Essa peroxidação lipídica também promove ativação da fosfolipase A₂ que, atuando sobre fosfolípidos da membrana celular, libera ácidos graxos que são metabolizados pela ciclo-oxigenase, gerando prostaglandinas e tromboxana, ou pela lipo-oxigenase, gerando os leucotrienos. Além das lesões diretas sobre as células as ERTOs participam junto com outros mediadores, tais como tromboxana A₂, leucotrienos e fator de ativação plaquetária, de interações entre leucócitos e o endotélio, que provocam aumento da permeabilidade capilar e lesão tecidual (RUIZ-MEANA; GARCÍA-DORADO, 2009).

2.3 Espécies reativas tóxicas de oxigênio e pré-condicionamento isquêmico

A partir destes conhecimentos, uma incessante busca por um meio de se prevenir ou minimizar os efeitos deletérios da I/R tem sido empregada por pesquisadores em todo o mundo.

Considerando que a xantina-oxidase age como mediadora na formação das ERTOs durante a reperfusão, tanto sua formação quanto o controle de sua concentração tecidual e de seus substratos são fatores que podem ser bloqueados na tentativa de se evitar a ação das ERTOs na patogênese da lesão por I/R. Assim, quaisquer fatores que possam controlar a conversão de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase, ou os substratos necessários a esta conversão, poderiam ser considerados mecanismos aptos a proteger os tecidos da lesão de I/R (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005). É o que provavelmente ocorre quando se realiza o PrCI.

Pré-condicionamento isquêmico é definido como um ou mais curtos períodos de isquemia com reperfusão intermitente visando proteger os tecidos dos efeitos maléficos de uma isquemia mais prolongada e sustentada. O conceito de PrCI foi introduzido na literatura por Murry, Jennings e Reimer em 1986. Estes autores descreveram o efeito benéfico de curtos períodos de oclusão coronária seguidos também por curtos períodos de reperfusão, antes de se iniciar a fase de isquemia propriamente dita, observando redução na lesão miocárdica isquêmica em cães. Este efeito protetor foi posteriormente descrito em outros órgãos como intestinos,

rins, fígado, cérebro, medula espinhal, retina e músculo esquelético (COSTA; FONTES-CARVALHO; LEITE-MOREIRA, 2013).

Existem evidências de que o PrCI atenua os efeitos da I/R pela redução do estresse oxidativo, da apoptose, da conversão da xantina-desidrogenase em xantina-oxidase e da adesão leucocitária (MALLICK *et al.*, 2005). Alguns autores relacionam também este efeito protetor com a ação isolada ou sinérgica da norepinefrina, bradicinina e alguns opióides. Estas substâncias ligam-se aos receptores de superfície das células, promovendo ativação e translocação da proteína C-quinase, e, finalmente, à abertura dos canais de potássio mitocondriais e/ou sarcolemais (DICKSON *et al.*, 2002).

A ativação dos neutrófilos é responsável pelo desenvolvimento de disfunção celular pós-isquêmica, o que tem levado à realização de pesquisas para avaliar o potencial de inibição da adesão leucócito-endotelial celular como uma das possíveis abordagens na prevenção das lesões de reperfusão (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

Alguns autores acreditam que a proteção do estresse oxidativo pode ser considerada como um mecanismo de ação do PrCI. Neste sentido, sabe-se que o óxido nítrico, um dos mediadores que ativa a resposta ao PrCI, tem a capacidade de inibir a ação da xantina-desidrogenase e xantina-oxidase. Esta inibição pode ser mediada pela ligação direta com a enzima ferro sulfúrico ou com as do grupo sulfidrila. O fato do óxido nítrico poder agir como inibidor da transformação de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase pode ser a explicação do seu poder protetor observado no PrCI. O bloqueio da síntese do óxido nítrico pode inibir parte da proteção oferecida por este processo, o que reforça a hipótese de sua importância como um dos mediadores implicados na resposta ao PrCI (COSTA; FONTES-CARVALHO; LEITE-MOREIRA, 2013).

O PrCI reduz a extensão da conversão de desidrogenase em oxidase, indicando que um dos mecanismos do PrCI pode ser a inibição da conversão de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase (SANADA; KOMURO; KITAKAZE, 2011). Chu *et al.* (2015), relataram que a proteção frente ao insulto isquêmico ocorre apenas se houver uma quantidade grande o suficiente de adenosina para gerar óxido nítrico, e uma quantidade de xantina baixa o suficiente para não remover o óxido nítrico gerado.

A estimulação dos receptores de adenosina A₁ durante o PrCI aumenta a atividade da fosfolipase C. Este aumento, por sua vez, induz à formação de

diacilglicerol, promovendo a translocação e ativação da fosfoquinase C nas membranas celulares. Posteriormente, esta ativação da fosfoquinase C pode também ocorrer quando receptores de adenosina estão repopulados durante isquemia prolongada. Considerando que este esquema indica que a adenosina serve como iniciador do PrCI, outros mecanismos podem também contribuir, incluindo ativação de receptores alfa-1-adrenérgicos, bradicinina, opióides, oxidantes e óxido nítrico. Apesar dos conhecimentos quanto a ativação dos receptores de adenosina e da fosfoquinase C no PrCI, os efeitos que se seguem a estas ações são ainda incertos. Acredita-se que a ativação de canais de potássio possa agir como efetor celular no coração (CHU *et al.*, 2015).

Estas observações são importantes porque indicam que além da proteção contra os efeitos deletérios da isquemia, a capacidade do PrCI de induzir alterações celulares também pode prevenir o recrutamento de leucócitos para os tecidos isquêmicos, podendo assim limitar os efeitos do componente reperfusão na lesão por I/R, o qual é primariamente dependente de leucócitos no intestino delgado e em outros órgãos (ERLING *et al.*, 2013).

Uma das bases do mecanismo quimiosmótico de transdução de energia é a impermeabilidade da membrana mitocondrial interna a solutos que não sejam dotados de sistemas específicos de transporte. A impermeabilidade da membrana pode ser afetada por ação das ERTOS na membrana mitocondrial ou em decorrência da transição de permeabilidade da mesma. A transição de permeabilidade mitocondrial é um fenômeno caracterizado por aumento não seletivo da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, mediada por cálcio e outros agentes indutores, dentre eles, ERO. A presença de cálcio na matriz mitocondrial é o requisito mais importante para a indução da permeabilidade da membrana. Tem-se observado que sob determinadas condições, ocorre aumento de permeabilidade das mitocôndrias seguido de intumescimento osmótico na matriz e muitas evidências apontam para a participação das ERTOS neste processo (KALOGERIS; BAO; KORTHUIS, 2014). Estudos experimentais demonstraram que em presença de cálcio o grupo que sofre isquemia tem intumescimento osmótico mitocondrial mais acentuado, tanto em relação a controles como aos grupos com PrCI, sugerindo possível participação de ERTOS na indução do processo, que por sua vez seria prevenido pelo PrCI, diminuindo a formação dessas espécies por mecanismos protetores mitocondriais (CASTRO e SILVA Jr *et al.*, 2002).

Tem sido demonstrado que a exposição a baixas concentrações de EROTO pode reproduzir os efeitos benéficos do PrCI em modelos experimentais de I/R miocárdica (ZHOU; CHUANG; ZUO, 2015). Esta pode ser também a explicação para os efeitos sistêmicos do PrCI na prevenção de lesão à distância. Várias situações clínicas onde ocorre isquemia seguida de reperfusão como infarto agudo do miocárdio, isquemia intestinal, transplantes de órgãos, etc., embora tratados adequadamente do ponto de vista de manter a viabilidade do órgão afetado, resultam em óbito do paciente. Acredita-se que os efeitos sistêmicos das EROTO, em altas doses, contribuem de forma considerável para o aumento da morbidade e mortalidade nestes casos.

Assim, sabemos que o PrCI tem importante papel na prevenção das lesões de I/R. Entretanto, quando avaliamos sua ação especificamente sobre os intestinos, seu benefício fica limitado a poucas situações clínicas, como em casos de transplante intestinal e circulação extracorpórea.

2.4 Tratamento farmacológico da Síndrome de isquemia e reperfusão

Paralelamente às tentativas de tratamento da Síndrome de Reperfusão com o PrCI, muitos autores tem buscado opções farmacológicas que possam alcançar os mesmos ou melhores resultados. Há uma série de medicamentos empregados experimentalmente com este fim, alguns com bons resultados, porém, nenhum que se destacasse a ponto de ser incorporado na prática clínica.

Kumamoto *et al.* (1997) utilizaram aminossalicilatos administrados por via intestinal de ratos e observaram um efeito positivo na prevenção da lesão de I/R, porém, utilizando tempo muito reduzido de isquemia.

Biondo-Simões *et al.* (2000) estudaram o uso de eritromicina administrada previamente à I/R mesentérica em ratos e observaram não haver benefício utilizando tal substância em relação ao grupo controle.

Estudando a L-arginina como protetor da injúria tecidual na I/R intestinal, Ward *et al.* (2000) obtiveram menor lesão tecidual em comparação com o grupo controle. Também Guo *et al.* (2000) estudaram a L-arginina e observaram um aumento na produção de óxido nítrico e consequente redução da injúria pós-isquemia e reperfusão intestinal. De maneira oposta, Khanna *et al.* (2000) afirmaram

que o óxido nítrico apresenta fundamental participação na I/R, estando o aumento de seus níveis relacionados a proporcional aumento na injúria tecidual.

Klotz *et al.* (2001) comprovaram que a papaverina pode ser utilizada na vasodilatação mesentérica pacientes com isquemia mesentérica, mas sua eficácia é parcial. Eker *et al.* (1999) também relataram um caso de paciente com boa resposta à papaverina em isquemia mesentérica não-oclusiva após revascularização miocárdica com circulação extra-corpórea, enquanto Caleb (2001) aplicou o mesmo tratamento em três pacientes em iguais situações e todos foram a óbito.

No Brasil, Macareno *et al.* (2001) constataram que o extrato de *Ginkgo-biloba* e amido hidroxietílico hipertônico não oferecem proteção tecidual na I/R intestinal em ratos.

Santos *et al.* demonstraram em 2003 que o Propofol foi capaz de minimizar as lesões de I/R mesentérica em ratos, em trabalho no qual submeteram os animais à isquemia durante 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial seguida de reperfusão por 60 minutos. O mesmo fármaco teve sua eficácia comprovada neste processo em 2008, conforme publicação de Liu *et al.*, na qual os autores submeteram ratos a I/R intestinal.

A ketamina foi também avaliada com este propósito (CÂMARA *et al.*, 2008) em estudo no qual ratos foram submetidos a I/R intestinal observou-se menor grau de lesão tecidual em comparação ao grupo controle.

Em 2008, Cerqueira *et al.* demonstraram que a pentoxifilina foi eficaz na proteção tecidual em ratos sob I/R intestinal. A pentoxifilina associada a solução salina também apresentou bons resultados na prevenção da lesão de reperfusão em ratos submetidos a I/R (MARQUES *et al.*, 2014). Este fármaco já havia sido empregado anteriormente por Hammerman *et al.* (1999) em estudo experimental também com resultados semelhantes.

A emulsão lipídica ômega-3 (ARISUE *et al.*, 2012), o remifentanil (CHO *et al.*, 2013) e o anticorpo anti-fator de necrose tumoral alfa Infiximabe (AKDOGAN *et al.*, 2014) também apresentaram efeito protetor no intestino de ratos submetidos a I/R. Outros estudos observaram a eficácia da citrulina (LAI *et al.*, 2015), de ozônio intraperitoneal (ONAL *et al.*, 2015), e da melatonina (OZBAN *et al.*, 2015) na I/R intestinal de ratos.

Além da avaliação dos fármacos na proteção à lesão de reperfusão intestinal, também a lesão remota foi objeto de estudo. Em 2015, Jiang *et al.* avaliaram o

ginsenosídeo no processo de I/R mesentérica, observando que este foi capaz de diminuir a lesão de reperfusão intestinal, bem como amenizar a lesão pulmonar remota. Outra publicação avaliou a proteção pulmonar com I/R intestinal em ratos, mostrando que a curcumina tem efeito anti-oxidante e anti-inflamatório remoto (FAN *et al.*, 2015). Com objetivo semelhante, Zhao *et al.* (2014) comprovaram a proteção pulmonar em ratos submetidos a I/R mesentérica com o uso de propofol.

2.5 Pós-condicionamento isquêmico

Muitos avanços têm sido alcançados em estudos experimentais na busca de um fármaco capaz de prevenir as lesões de I/R, para utilização nas situações acima descritas. Porém, até o momento não há estudos que permitam a utilização destes fármacos com esta finalidade em seres humanos.

Com esta lacuna ainda a ser preenchida no tratamento da I/R, e, considerando os grandes benefícios demonstrados com o PrCI, alguns autores têm utilizado com sucesso o PoCI (LIM *et al.*, 2007; SCHIPKE *et al.*, 2006; VINTEN-JOHANSEN, 2007; ZHAO *et al.*, 2003).

O PoCI consiste na realização de um ou mais ciclos curtos de reperfusão seguidos por um ou mais ciclos curtos de isquemia, imediatamente após a fase de isquemia e antes de ocorrer a reperfusão permanente. Este conceito foi introduzido em 2003 por Zhao *et al.* em publicação onde demonstraram que o PoCI foi tão eficaz quanto o PrCI na prevenção de lesão tecidual em cães submetidos a I/R miocárdica. Este estudo levou a outros trabalhos que de forma semelhante têm demonstrado a capacidade do PoCI de prevenir as lesões de I/R, tanto quanto o PrCI (SCHIPKE *et al.*, 2006).

Curtos e repetidos períodos de reperfusão realizados no PoCI estão relacionados com baixos níveis de malondialdeído, sugerindo atenuação da peroxidação lipídica e redução da produção de ânions superóxido. O PoCI pode limitar a oferta de oxigênio, que atua como substrato da produção de EROTO, e, assim, atenuar a lesão celular de reperfusão. Desta forma, uma diminuição na produção de EROTO pode reduzir a ativação endotelial e a adesão de polimorfonucleares (ZHAO *et al.*, 2003).

Além disso, o PoCI pode também agir de forma mecânica durante a reperfusão. O aumento da pressão na parede do vaso, que ocorre de maneira

abrupta na reperfusão, pode causar injúria tecidual e edema pelo estiramento endotelial e aumento do extravasamento líquido para o parênquima tecidual (HALLDORSSON *et al.*, 2000). Uma gradual restauração da pressão sobre o endotélio na reperfusão reduz a injúria microvascular, o tamanho do infarto e o edema tecidual (SATO *et al.*, 1997). O PoCI pode agir na modulação das forças hidrodinâmicas durante a reperfusão e assim diminuir o edema e a injúria endotelial (VINTEN-JOHANSEN, 2007).

Dentre as várias possíveis formas de atuação do PoCI na proteção contra as lesões teciduais por I/R estão a redução do estresse oxidativo e do acúmulo de neutrófilos, da disfunção endotelial e a atenuação da apoptose e do acúmulo de cálcio mitocondrial (KERENDI *et al.*, 2005). No PoCI ocorre ainda a ativação dos canais de potássio-ATP mitocondriais, inibindo o aumento de permeabilidade mitocondrial (LIM *et al.*, 2007), e, conseqüentemente, prevenindo a produção de peróxido e a depleção de glutatião (COUVREUR *et al.*, 2006).

Sun *et al.* (2005) também acreditam que a proteção oferecida pelo PoCI é decorrente da diminuição da produção das ERTOS, da redução da peroxidação lipídica e do acúmulo intracelular e mitocondrial de cálcio. Estes autores demonstraram que *in vitro*, mesmo na ausência de células inflamatórias, ocorre aumento da produção de ERTOS durante a reoxigenação e que esta produção é menor quando se realiza o PoCI.

Staat *et al.* (2005) e Darling *et al.* (2007) já demonstraram os efeitos benéficos do PoCI em seres humanos, realizando reperfusão intermitente durante angioplastia em pacientes com infarto agudo do miocárdio, tendo observado redução da injúria miocárdica. Jin *et al.* (2007) confirmaram haver benefício em se utilizar o PoCI em operações de troca de válvula cardíaca. Também Loukogeogarkis *et al.* (2006) realizaram estudo experimental em seres humanos em que provocavam isquemia transitória no membro superior seguida de reperfusão, observando efeito protetor do PoCI. Estes autores também demonstraram que os primeiros momentos da reperfusão são fundamentais para a proteção endotelial. Luo *et al.* (2007) utilizaram o PoCI em crianças operadas por tetralogia de Fallot e observaram melhores resultados em relação ao grupo controle. Thibault, Piot e Ovize (2007), em artigo de revisão sobre o uso do PoCI em seres humanos, concluíram que este poderia ser um grande avanço no tratamento do infarto agudo do miocárdio.

Na I/R miocárdica já está bem estabelecido que a proteção oferecida pelo PoCI não é acidental, resultado de um único estudo, ou exclusiva de um modelo experimental ou espécie animal, uma vez que tem sido demonstrada sua eficácia em cardiomiócitos isolados, corações isolados, em corações *in situ* de ratos, camundongos, coelhos, porcos e cães (SCHIPKE *et al.*, 2006). Isquemia cardíaca (COUVREUR *et al.*, 2006; CSEREPES *et al.*, 2007; DARLING *et al.*, 2007; JIN *et al.*, 2007; KERENDI *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2007; LUO *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2007; STAAT *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2005; THIBAUT; PIOT; OVIZE, 2007; VINTEN-JOHANSEN, 2007; ZHAO *et al.*, 2003), renal (LIU *et al.*, 2007), cerebral (REHNI e SINGH, 2007) e da medula espinhal (HUANG *et al.*, 2007) também já foram tratadas de forma eficaz por este método. Na I/R mesentérica, Santos *et al.* apresentaram em 2008 os resultados positivos do PoCI na diminuição das lesões de reperfusão em ratos submetidos a I/R mesentérica.

Em outro estudo, Santos *et al.* (2009) propuseram avaliação do PoCI utilizando-se de ciclos de reperfusão e isquemia (R/I) mesentérica (três ciclos alternados de dois minutos cada), após a isquemia de 30 minutos, e antecedendo a reperfusão de 60 minutos. Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o PoCI também exerceu efeito protetor. Porém, em 2010, Bretz *et al.*, publicaram estudo cujo objetivo era determinar se o PoCI poderia realmente atenuar a injúria causada pelo processo de I/R. Foram avaliados coelhos (n=6), sendo divididos em grupo controle (1), grupo I-R (2), Grupo I-R com PoCI. A I/R foi realizada por 45 minutos de oclusão de segmento da artéria jejunal, seguida de duas horas de reperfusão. O PoCI foi realizado com quatro ciclos de 30 segundos de reperfusão e 30 segundos de reclusão, durante os quatro minutos iniciais da reperfusão. Ao final da reperfusão, segmentos do intestino foram colhidos e os animais submetidos a eutanásia. A avaliação histopatológica semiquantitativa foi realizada por um único observador. Os resultados foram de que não houve diferença significativa no grau de necrose entre os grupos.

Recentemente, Nakamura *et al.* (2014) também não observaram efeito protetor do PoCI na I/R mesentérica. Estes autores aplicaram o PoCI por meio de cinco ciclos de R/I com duração de 30 segundos cada.

A maioria das publicações com a utilização do PoCI mostrou eficácia do método na prevenção ou diminuição das lesões de reperfusão tanto intestinais como em outros órgãos, mas como apresentado acima, existem algumas poucas

divergências. Isto pode dever-se ao fato de que os estudos são heterogêneos, utilizando diferentes animais, estudando diferentes órgãos, e, principalmente, empregando o PoCI de maneiras muito diversas, com número de ciclos e duração dos mesmos diferentes. Acrescenta-se a isso as diferenças quanto ao tempo de I/R empregados.

Isto significa que embora a maior parte das evidências existentes até o momento apontem para a eficácia do PoCI, em especial na I/R mesentérica, deve-se ainda investigar qual o melhor método de aplicação do mesmo, porque pode haver diferença no resultado de acordo com o número e duração dos ciclos de R/I.

2.6 Efeito do pós-condicionamento isquêmico na lesão de reperfusão à distância

A interrupção do fluxo sanguíneo para um determinado órgão seguida de reperfusão provoca danos locais e à distância, principalmente devido à liberação de ERTTO (THOMAZ NETO *et al.*, 2013). Da mesma forma, o PrCI e PoCI atuam sobre o órgão primário e sobre os órgãos distantes, por vias humorais ou neurais que promovem efeitos sistêmicos (HAUSENLOY; YELLON, 2009; SU *et al.*, 2009).

Estudos experimentais têm sugerido que o PoCI protege contra a lesão endotelial em seres humanos e pode oferecer proteção significativa em vários órgãos, não só o coração. Niu *et al.* (2014), em recente análise de estudos randomizados com metanálise, concluíram que o PoCI foi eficaz na prevenção de lesão miocárdica remota em pacientes com *stents* coronarianos.

Crimi *et al.* (2013) realizaram o PoCI remoto pela oclusão e reperfusão vascular de membro inferior em pacientes com infarto agudo do miocárdio e, quando comparados ao grupo controle, estes pacientes apresentaram menor área de infarto e menor elevação das enzimas cardíacas, sugerindo uma ação protetora à distância. Também pesquisando o efeito do PoCI remoto, Garbaisz *et al.* (2013) realizaram I/R de membro inferior de ratos, avaliando as repercussões pulmonares com e sem PoCI, constatando que este método foi capaz de diminuir a lesão de reperfusão.

Deftereos *et al.* (2013) também avaliaram a ação remota do PoCI. Os autores avaliaram pacientes submetidos a procedimento coronariano percutâneo e observaram que os pacientes do grupo PoCI apresentaram menor proporção de

insuficiência renal aguda quando comparados ao grupo controle com diferença estatisticamente significativa.

Embora já existam muitas evidências da eficácia do PoCI agindo à distância de vários órgãos submetidos à I/R, a maioria das publicações são voltadas à isquemia coronariana. Na literatura pesquisada, apenas Onody *et al.* (2012) pesquisaram o efeito do PoCI no fígado após I/R mesentérica, demonstrando eficácia do método, porém, sem demonstração histológica como tem sido realizado pela maioria dos autores.

Algumas pesquisas sobre a ação remota do PoCI sobre o pulmão já foram publicadas (LIM; HAUSENLOY, 2012). Não há, entretanto, até o presente momento, publicação de estudos visando avaliar este método após a I/R mesentérica.

A via humoral é diretamente envolvida neste processo. A ativação de adenosina (KERENDI *et al.*, 2005; PELL *et al.*, 1998; TAKAOKA *et al.*, 1999; TSUBOTA *et al.*, 2010), bradicinina-2, opióides (DICKSON *et al.*, 2002; PATEL *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2011), eritropoetina (DIWAN *et al.*, 2008), receptores de angiotensina-1 (SINGH; CHOPRA, 2004), prostaglandinas e as vias de sinalização associadas tem sido implicados na mediação do efeito protetor do condicionamento remoto. No entanto, se estas substâncias endógenas são geradas no órgão alvo e transportadas àqueles condicionados remotamente, isto permanece desconhecido.

A resposta sistêmica apresentada pelo PoCI ocorre envolvendo a modulação de células imunes, quer a nível de pós-tradução ou por meio de regulação da transcrição (SAXENA *et al.*, 2010). A análise de amostras de sangue obtidas a partir de voluntários humanos saudáveis sujeitos a breve isquemia do antebraço revelou supressão de genes que codificam para proteínas pró-inflamatórias envolvendo quimiotaxia de leucócitos, a adesão, migração, e a exocitose, bem como respostas de imunidade inata, a síntese de citocinas, e a apoptose. Por outro lado, os genes anti-inflamatórios como a calpastatina foram regulados positivamente (KONSTANTINOV *et al.*, 2005). As alterações desse perfil de expressão gênica estão correlacionadas com alterações funcionais em leucócitos humanos que podem ser encontradas até 10 dias após o PoCI (SHIMIZU *et al.*, 2010).

Assim, frente às várias evidências de efeito protetor do PoCI à distância em muitas situações de I/R, porém, faltando ainda pesquisa específica do seu efeito protetor pulmonar na I/R mesentérica, além do aprofundamento dos conhecimentos

sobre sua ação no fígado em tal circunstância, justifica-se a presente pesquisa visando elucidar esta lacuna nos conhecimentos científicos deste processo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de dois diferentes métodos de pós-condicionamento isquêmico no processo de isquemia e reperfusão mesentérica em ratos.

3.2 Objetivos específicos

Para a construção do objetivo geral, comparando-se dois diferentes métodos de pós-condicionamento isquêmico, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar a eficácia do pós-condicionamento isquêmico na proteção local no processo de isquemia e reperfusão mesentérica em ratos.
- b) avaliar a eficácia do pós-condicionamento isquêmico na proteção hepática de ratos submetidos a isquemia e reperfusão mesentérica.
- c) avaliar a eficácia do pós-condicionamento isquêmico na proteção pulmonar de ratos submetidos a isquemia e reperfusão mesentérica.

4 MÉTODO

4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética

Foram seguidas as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo certificado 594/2014 (anexo).

4.2 Animais estudados

Foram estudados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso variando de 270 a 350 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.3 Grupos constituídos

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos (figura 1):

- Grupo A – Isquemia e Reperfusão (I/R):

Dez ratos submetidos a isquemia intestinal por 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular (Pinça Bulldog De Bakey, delicada, curva, 5cm, EDLO®), seguida por reperfusão de 60 minutos, pela retirada do clampe.

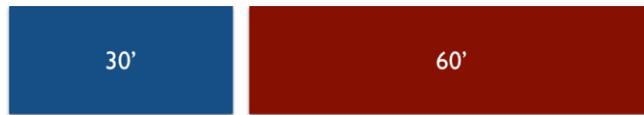
- Grupo B – Pós-condicionamento isquêmico 1 (PoCI-1):

Dez ratos submetidos ao procedimento de isquemia durante 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular e reperfusão por 60 minutos. Entre a isquemia e a reperfusão foram realizados dois ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com dois ciclos de isquemia (dois minutos cada).

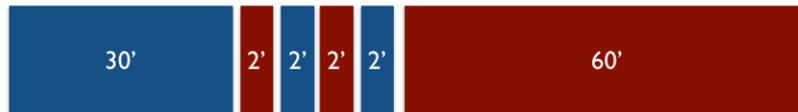
- Grupo C – Pós-condicionamento isquêmico 2 (PoCI-2):

Dez ratos submetidos ao procedimento de isquemia durante 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular e reperfusão por 60 minutos. Entre a isquemia e a reperfusão foram realizados quatro ciclos de reperfusão (30 segundos cada) intercalados com quatro ciclos de isquemia (30 segundos cada).

Grupo A



Grupo B



Grupo C

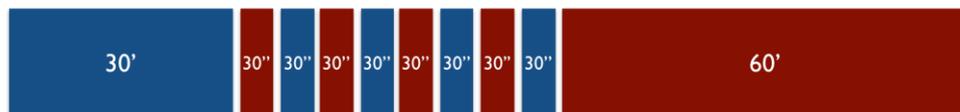


Figura 1 – Demonstração esquemática dos períodos de isquemia e reperfusão nos grupos A, B e C (os números correspondem ao tempo; em azul – isquemia; em vermelho – reperfusão).

4.4 Anestesia

Os animais foram pesados em balança eletrônica de precisão (Callmex® – modelo Q510) e anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de 2:1 de Cloridrato de Cetamina (Cetamin®), 50mg/mL, e Cloridrato de Xilazina (Xilazin®), 20mg/mL, respectivamente, na dose de 0,1mL/100g. Os ratos foram considerados anestesiados após ter sido constatada a perda do reflexo palpebral, perda de reação aos estímulos mecânicos, perda dos reflexos de endireitamento e retirada do membro após estímulo doloroso provocado por preensão.

4.5 Procedimento cirúrgico

Os ratos foram submetidos a tricotomia abdominal e posicionados à mesa operatória em decúbito dorsal com os quatro membros em abdução. Em seguida realizou-se laparotomia longitudinal mediana de aproximadamente quatro

centímetros, exteriorização do intestino delgado, identificação e dissecação da artéria mesentérica cranial (figura 2).

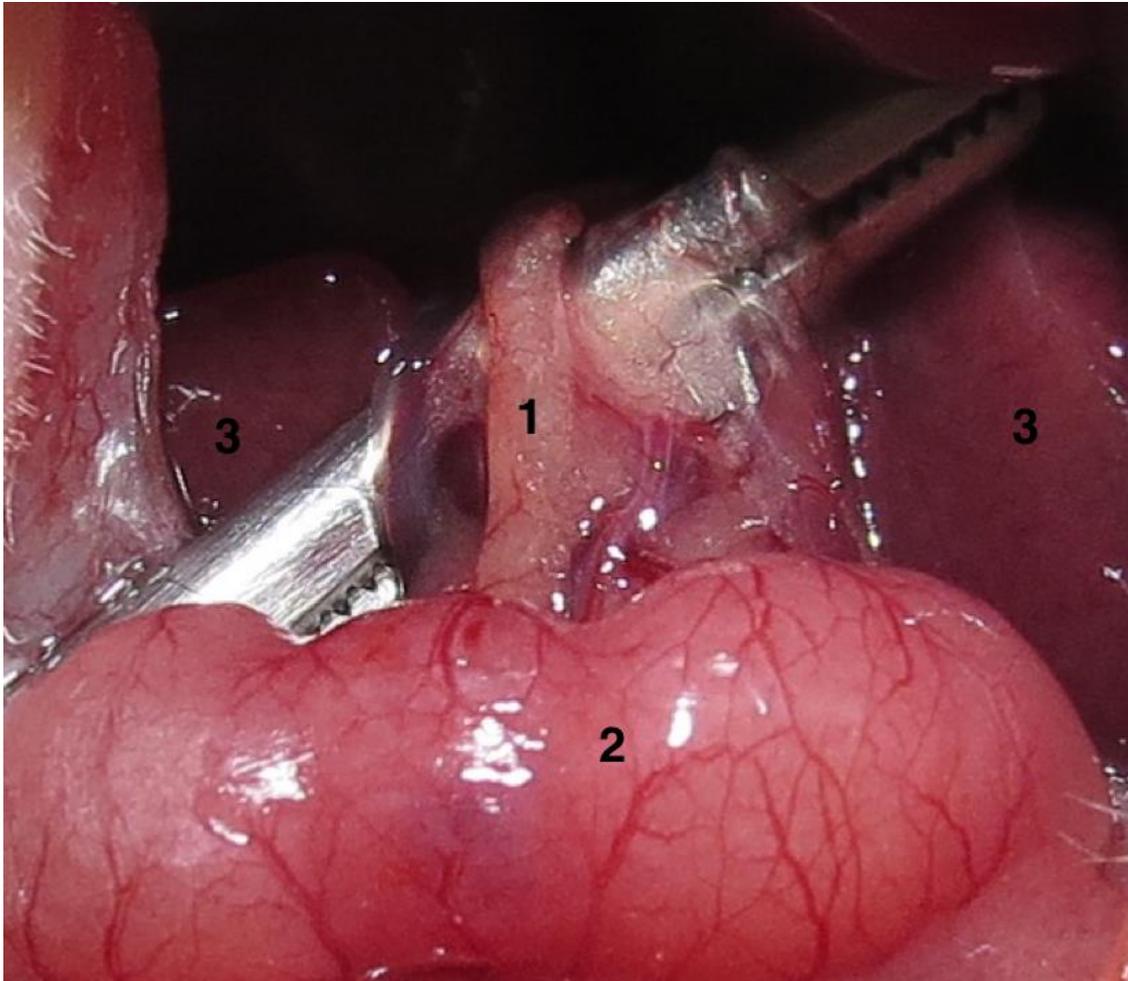


Figura 2 – Fotografia demonstrando a etapa de dissecação da artéria mesentérica cranial (1); intestino delgado (2); fígado (3).

No grupo A, a artéria mesentérica cranial foi ocluída por clampe vascular atraumático (figura 3) que permaneceu durante 30 minutos (fase de isquemia). Após a colocação do clampe, o intestino delgado foi reposicionado na cavidade abdominal e a ferida operatória foi fechada com sutura contínua da pele com fio de náilon monofilamentar (mononylon®) 4-0. Terminada a fase de isquemia, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura e o clampe vascular foi retirado, dando início à fase de reperfusão, com duração de 60 minutos. Nos três grupos, iniciada a fase de reperfusão, o abdome foi novamente fechado por sutura contínua da pele com fio de náilon monofilamentar 4-0 até o término do experimento.

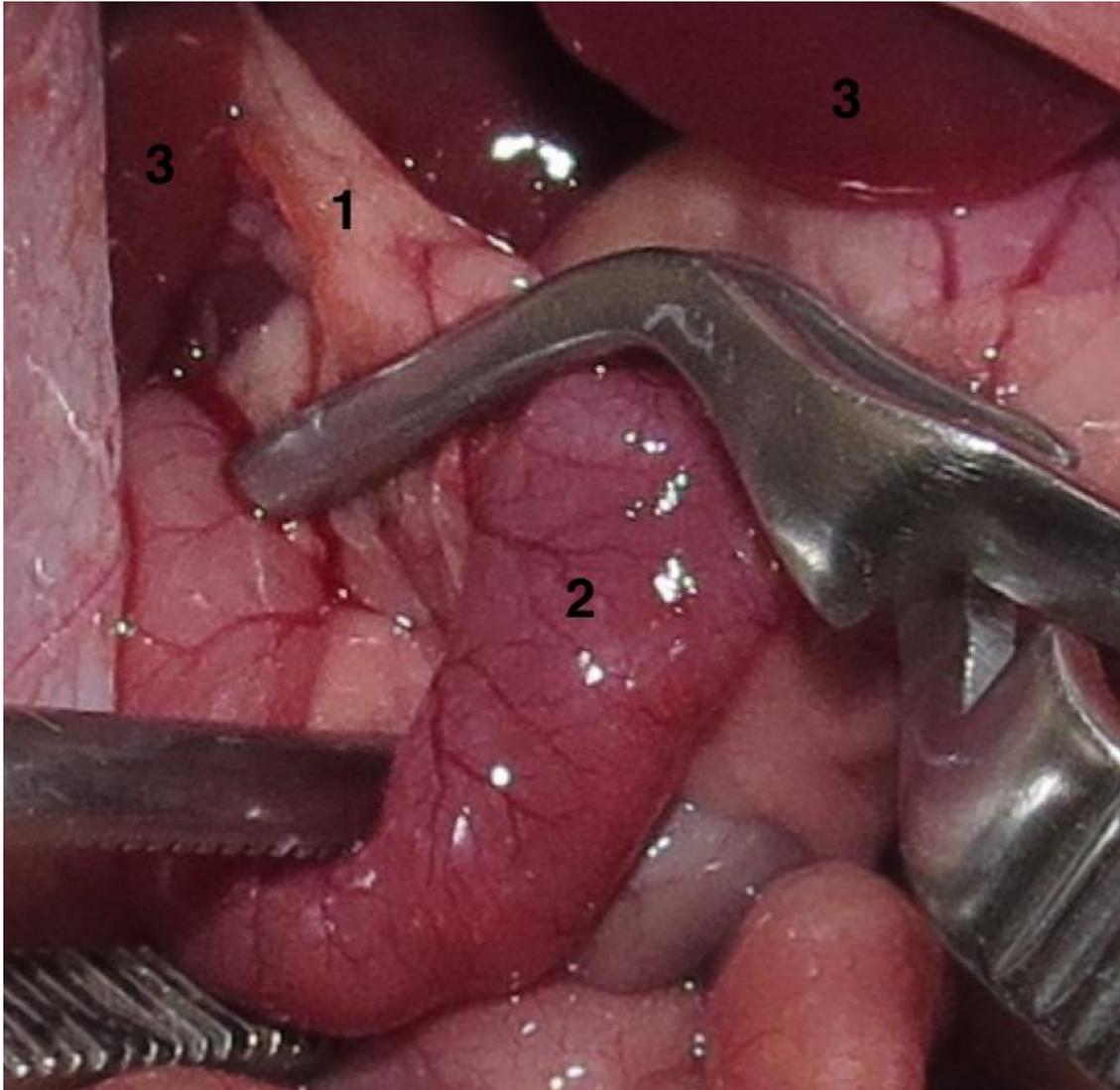


Figura 3 – Fotografia demonstrando a aplicação do clampe vascular na artéria mesentérica cranial (1); intestino delgado (2); fígado (3).

No grupo B, realizou-se a fase de isquemia por 30 minutos pela oclusão da artéria mesentérica cranial. Após a fase de isquemia realizou-se o PoCI por meio de dois ciclos de reperfusão, com duração de dois minutos cada (retirada do clampe da artéria mesentérica cranial), intercalados por dois ciclos de isquemia, também com duração de dois minutos cada (aplicação do clampe vascular atraumático na artéria mesentérica cranial). Após, realizou-se a reperfusão por 60 minutos.

No grupo C realizou-se a fase de isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos). Precedendo a fase de reperfusão foi realizado o PoCI por meio de quatro ciclos de reperfusão (retirada do clampe vascular atraumático da artéria mesentérica cranial) com duração de 30 segundos cada, intercalados com quatro ciclos de

isquemia (oclusão da artéria mesentérica cranial por clampe vascular atraumático), também com duração de 30 segundos cada.

Completada a fase de reperfusão, nos três grupos, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura e ressecou-se um segmento de aproximadamente um centímetro do íleo, cinco centímetros proximal à transição ileocecal, o qual foi aberto em sua borda antimesentérica. Ressecou-se também o lobo lateral esquerdo do fígado e, após abertura do diafragma e secção do esterno, ressecou-se ainda o lobo caudal do pulmão direito. Todos os espécimes foram lavados com solução salina e colocados separadamente em frascos de vidro previamente identificados contendo solução de formaldeído a 10% para posterior análise histológica (figura 4).

Os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento do plano anestésico.



Figura 4 – Fotografia dos espécimes ressecados para estudo histológico. (1) intestino delgado; (2) fígado; (3) pulmão.

4.6 Estudo histopatológico

Os espécimes ressecados, após fixação em solução de formaldeído a 10%, foram submetidos a processamento histológico por 12 horas no histotécnico automático (AUTOTECHNICON® DUO-TECHNICON CORPORATION – MOD 2A). Após o processamento foram embebidos em parafina e submetidos a cortes histológicos em micrótomo (Leica® 2025) a cada 4 μ m.

As lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e analisadas à microscopia óptica (microscópio Nikon® E200) pelo patologista, sem o prévio conhecimento

deste sobre o grupo pertencente de cada rato, e foram classificadas de acordo com o grau de lesão tecidual.

As amostras intestinais foram analisadas e os achados histológicos foram classificados segundo Chiu *et al.*(1970):

- Grau 0: mucosa sem alterações.
- Grau 1: vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou processo inflamatório, porém, com formação do espaço subepitelial de Grunhagen.
- Grau 2: presença de lises celulares, formação do espaço subepitelial de Grunhagen e espaçamento aumentado entre as vilosidades.
- Grau 3: destruição da porção livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e de células inflamatórias.
- Grau 4: destruição estrutural das vilosidades, havendo apenas esboço de algumas, formadas por células inflamatórias e material necrótico, com hemorragia e ulceração glandular basal.
- Grau 5: destruição de toda túnica mucosa, não mais sendo observado qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado sobre a tela submucosa.

Os achados histológicos das amostras hepáticas foram classificadas segundo Takeda *et al.* (2003):

- Grau 0: sem alterações histológicas.
- Grau 1: presença de congestão centrolobular.
- Grau 2: congestão centrolobular com alguma degeneração dos hepatócitos em uma ou duas veias centrais.
- Grau 3: congestão centrolobular multifocal e degeneração portal dos hepatócitos.

As amostras pulmonares, após estudo histológico, foram classificadas de acordo com Sizlan *et al.* (2009):

- Grau 0: ausência de lesão.
- Grau 1: leve infiltrado neutrofílico e leve a moderada congestão intersticial.
- Grau 2: moderado infiltrado neutrofílico, formação de edema perivascular e destruição parcial da arquitetura pulmonar.

- Grau 3: infiltrado neutrofílico denso e destruição completa do parênquima pulmonar.

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico, utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, estabelecendo-se nível de significância de $p < 0,05$. Para tal utilizou-se o programa Bioestat 5.0.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Médias dos graus de lesão intestinal nos animais estudados.

Ratos	Grupos		
	I/R	PoCI 1	PoCI 2
1	2	1	1
2	4	1	3
3	3	1	3
4	2	3	1
5	2	0	1
6	3	0	2
7	3	1	0
8	3	1	1
9	2	3	1
10	4	3	1
Médias	2,8	1,4	1,4

p=0,012 entre grupos A e B; p=0,012 entre grupos A e C;
p=0,867 entre grupos B e C.

Tabela 2. Médias dos graus de lesão hepática nos animais estudados.

Ratos	Grupos		
	I/R	PoCI 1	PoCI 2
1	1	1	1
2	2	1	2
3	1	2	1
4	1	3	1
5	2	2	2
6	3	1	1
7	1	1	2
8	1	1	1
9	3	3	1
10	3	2	1

Médias	1,8	1,7	1,3
---------------	-----	-----	-----

p=0,837 entre grupos A e B; p=0,210 entre grupos A e C;
p=0,259 entre grupos B e C.

Tabela 3. Médias dos graus de lesão pulmonar nos animais estudados.

Ratos	Grupos		
	I/R	PoCI 1	PoCI 2
1	1	1	1
2	1	1	1
3	1	1	1
4	1	1	1
5	1	1	1
6	1	1	1
7	1	1	1
8	1	1	1
9	1	1	1
10	1	1	1
Médias	1	1	1

p>0,05

A figura 5 demonstra o aspecto macroscópico do intestino ao término da fase de reperfusão, e as figuras 6, 7 e 8 ilustram os principais achados histológicos dos resultados acima.

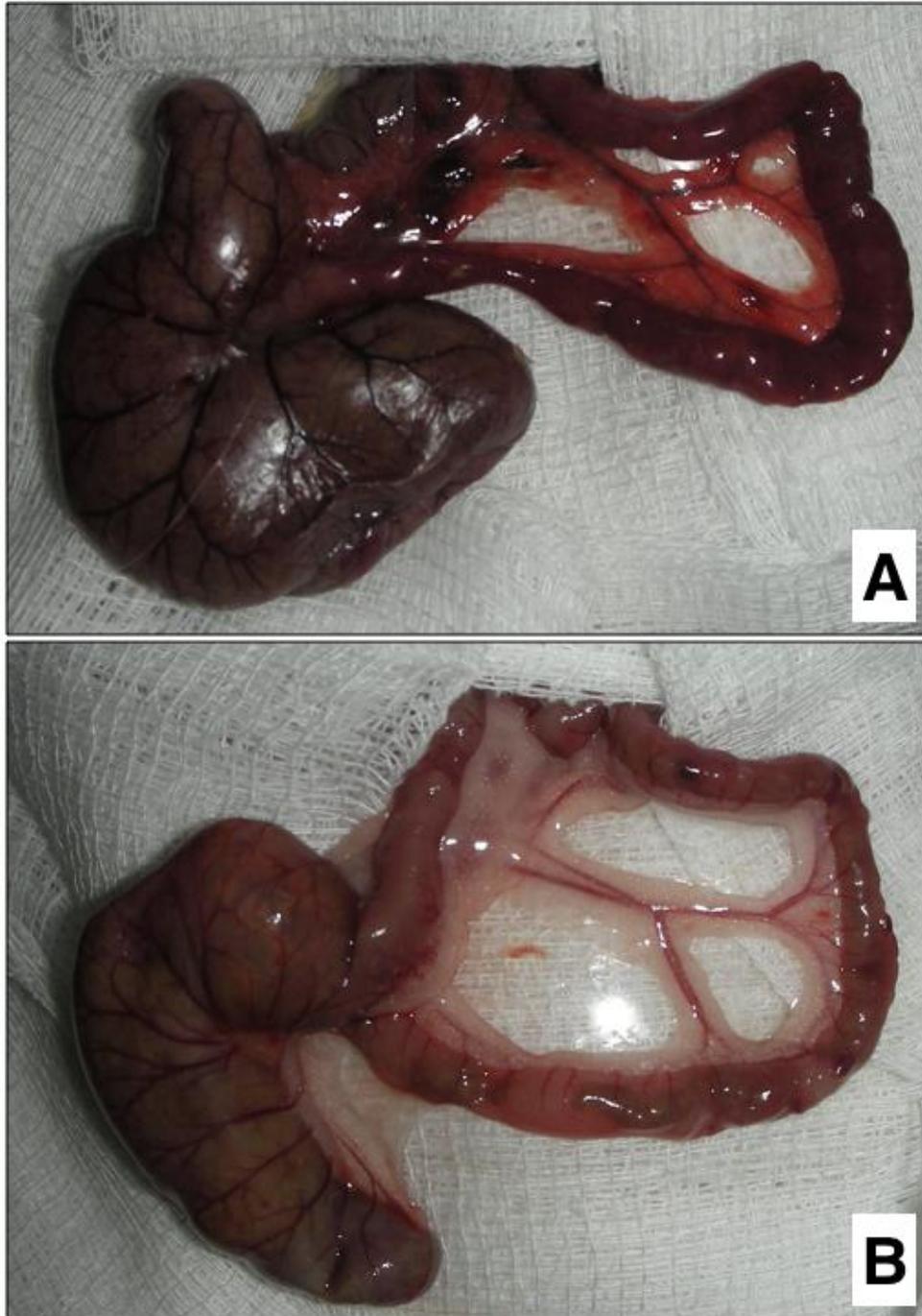


Figura 5 – Fotografia do aspecto macroscópico do intestino delgado e ceco dos animais após a fase de reperusão; A: grupo I/R; B: grupo PoCl-1.

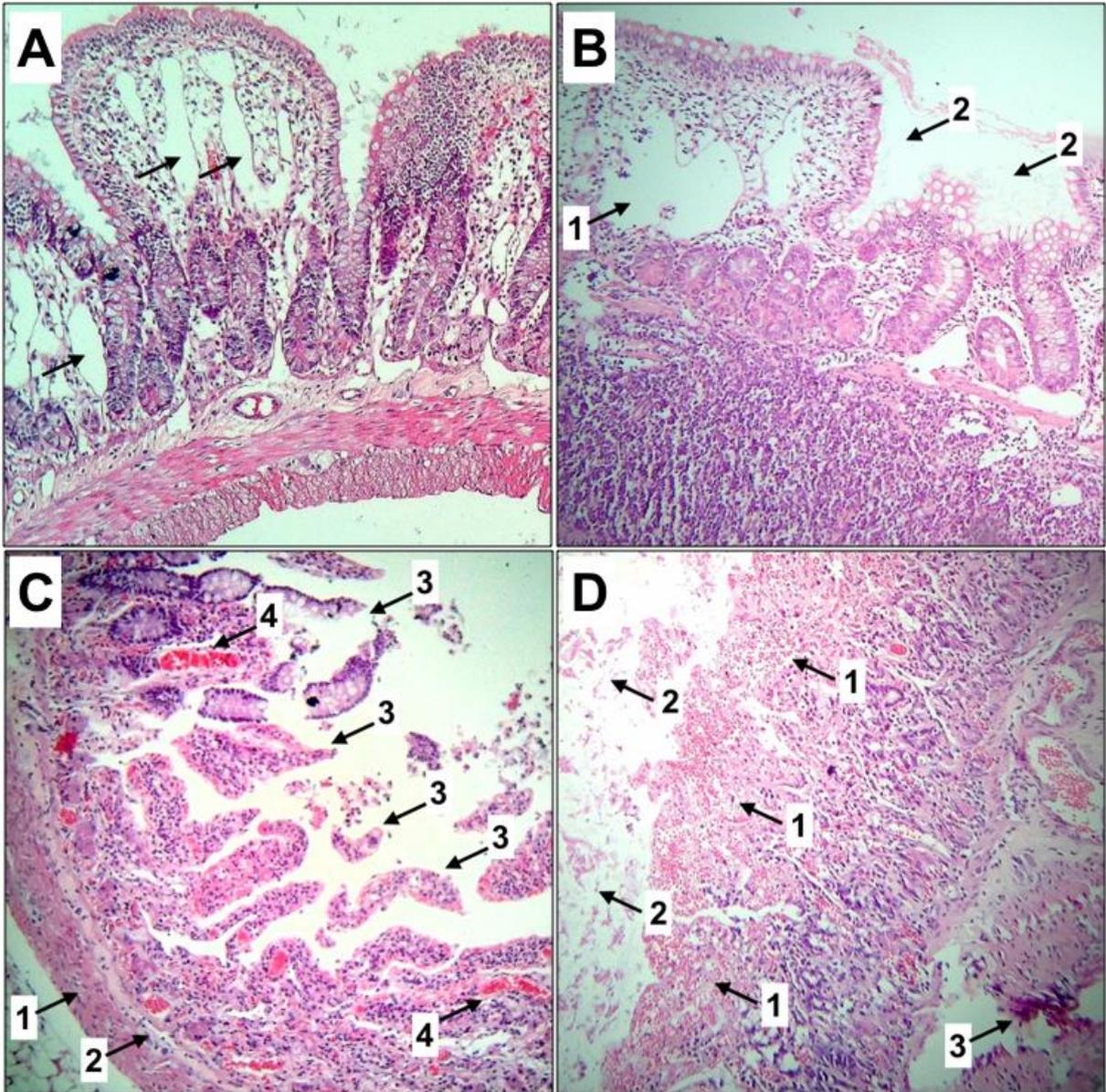


Figura 6 – Fotomicrografias demonstrando os graus de lesão intestinal de acordo com a classificação de Chiu *et al.* (1970). A: grau 1 – setas: espaço subepitelial de Grunhagen; B: grau 2 – seta 1: formação do espaço subepitelial de Grunhagen; setas 2: espaçamento aumentado entre as vilosidades; C: grau 3 – seta 1: túnica muscular; seta 2: lâmina própria; setas 3: destruição da porção livre das vilosidades; setas 4: capilares dilatados; D: grau 4 – setas 1: destruição estrutural das vilosidades; setas 2: material necrótico; seta 3: hemorragia e ulceração glandular basal (microscopia óptica 100X – coloração hematoxilina-eosina).

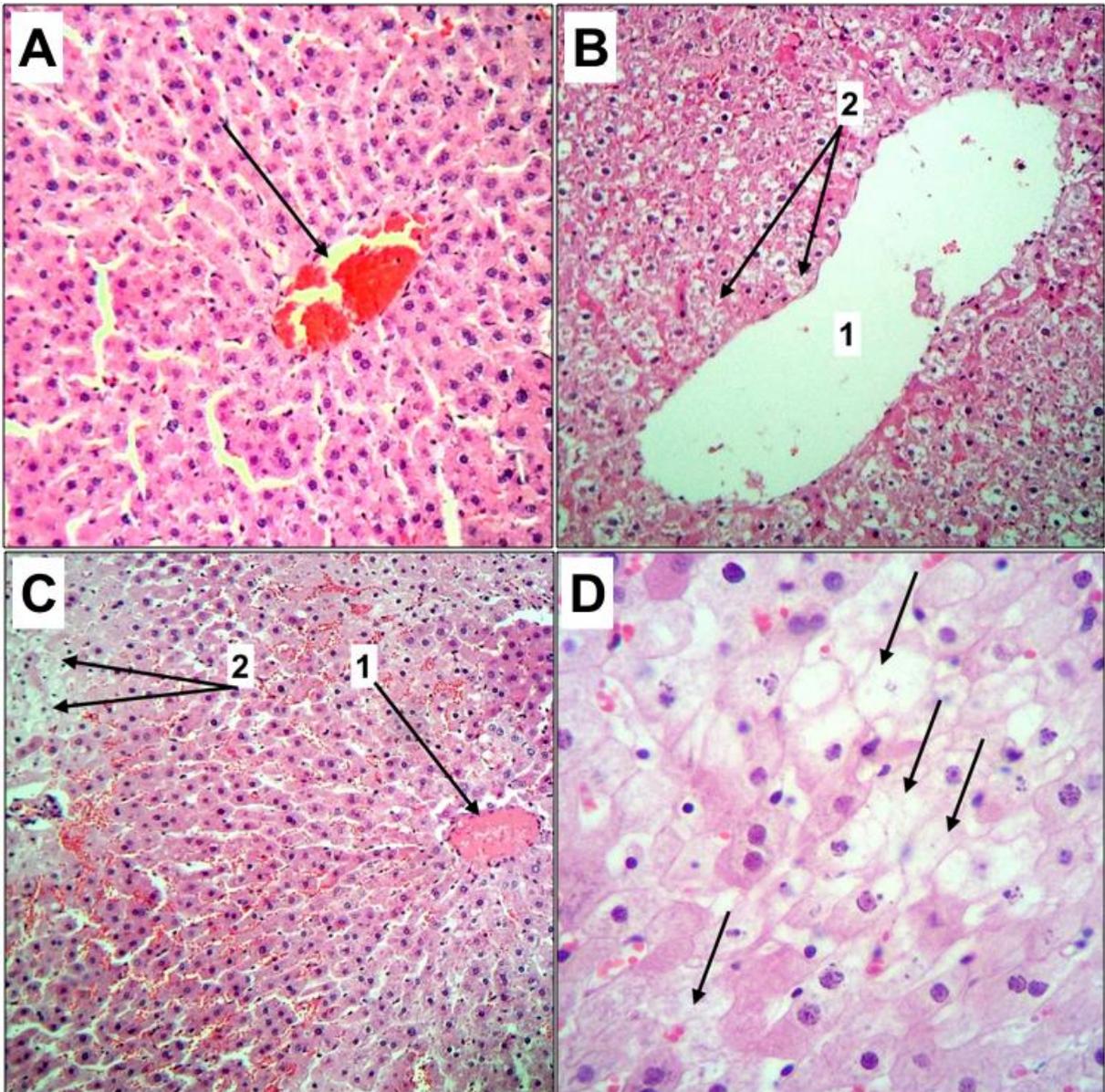


Figura 7 – Fotomicrografias demonstrando os graus de lesão hepática de acordo com a classificação de Takeda *et al.* (2003). A: grau 1 – seta: congestão da veia centrolobular; B: grau 2 – 1: congestão da veia centrolobular; setas 2: degeneração parcial dos hepatócitos; C: grau 3 – seta 1: congestão centrolobular; seta 2: degeneração portal dos hepatócitos; D: grau 3 – setas: degeneração portal dos hepatócitos com necrose (A, B e C – microscopia óptica 100X; D – microscopia óptica 400X – coloração hematoxilina-eosina).

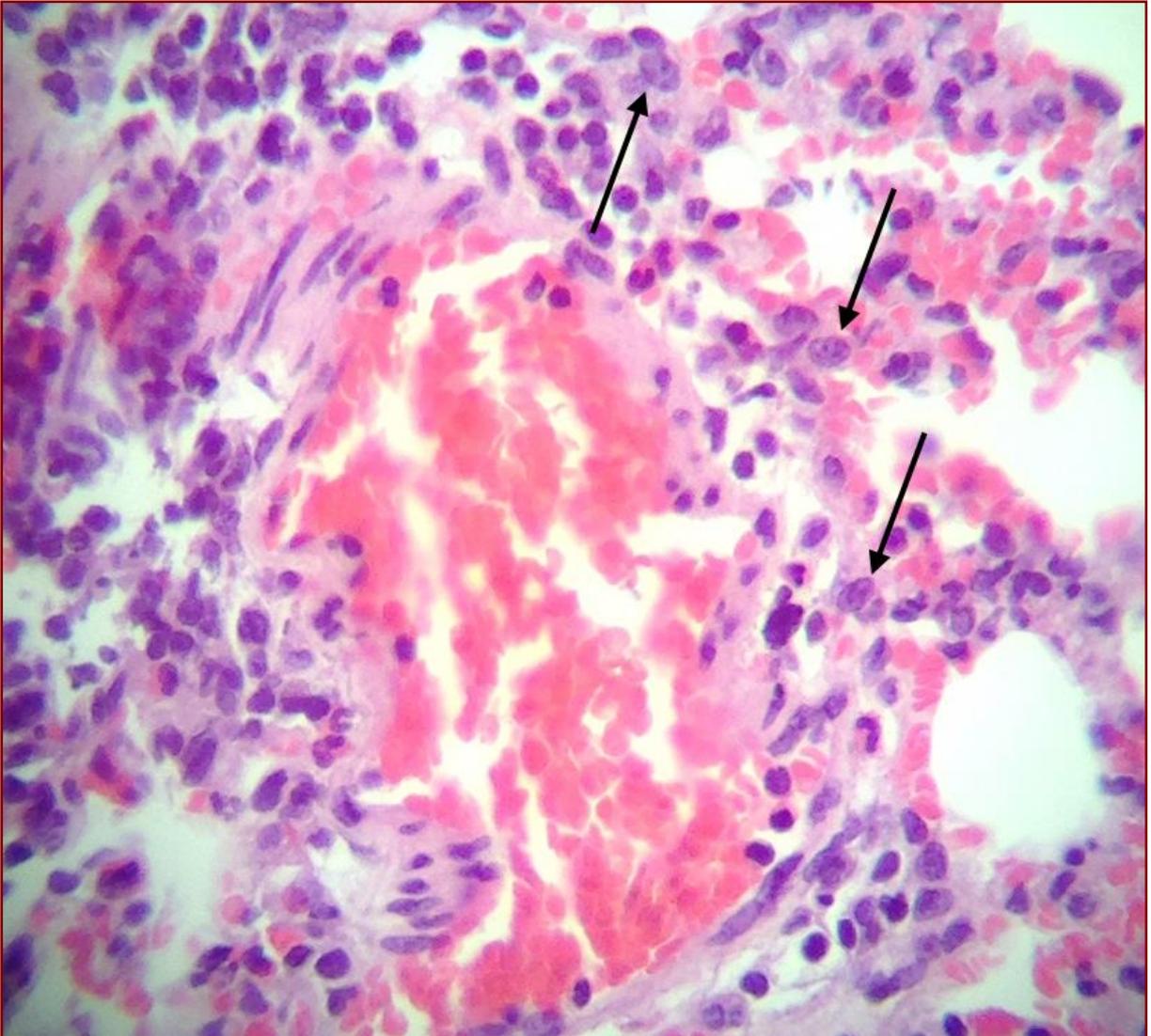


Figura 8 – Fotomicrografia demonstrando lesão pulmonar grau 1 da classificação de Sizlan *et al.* (2009). Setas: infiltrado neutrofílico (microscopia óptica 400X – coloração hematoxilina-eosina).

6 DISCUSSÃO

Desde sua descrição em 2003 por Zhao *et al.* avaliando lesão de reperfusão miocárdica, o PoCI tem-se mostrado eficaz na prevenção das lesões de reperfusão em diferentes órgãos e tecidos, porém, apesar dos benefícios alcançados experimentalmente com o PoCI há 13 anos, pouco se avançou na prática clínica, uma vez que um limitado número de pesquisas científicas foram realizadas neste sentido (LOUKOGEORGAKIS *et al.*, 2006; RICCA *et al.*, 2015; STAAT *et al.*, 2005). Isto provavelmente deve-se ao fato de haver ainda muitas dúvidas quanto a melhor forma de aplicar o PoCI, já que as publicações são bastante heterogêneas em relação aos órgãos estudados, animais, tempos de I/R e, principalmente, número e duração dos ciclos de R/I do PoCI propriamente dito. Esta foi a principal motivação para a análise de dois diferentes métodos de PoCI na I/R mesentérica, observando-se, no entanto, que não houve diferença entre os grupos PoCI-1 e PoCI-2, e que ambos foram capazes de minimizar os efeitos deletérios da reperfusão intestinal em ratos submetidos à I/R mesentérica.

O mecanismo de proteção do PoCI no processo de I/R mesentérica ainda não é totalmente claro, mas existem evidências de que o PoCI possa estar relacionado a uma diminuição significativa nos níveis de malondialdeído e produtos relacionados a peroxidação lipídica. Estas observações sugerem uma redução na produção de ERTOS e menor injúria mediada por oxidantes com o PoCI (ONAL *et al.*, 2015).

Isquemia seguida por reperfusão pode induzir a apoptose e uma resposta inflamatória que afeta a reparação dos tecidos. Como resultado, muitos têm avaliado o impacto do PoCI nas respostas apoptóticas e inflamatórias subsequentes. Em modelos experimentais de I/R em ratos com 30 minutos de isquemia e três horas de reperfusão houve diminuição significativa de necrose tecidual com utilização do PoCI. Ocorre ainda diminuição na geração de ERTOS e proteção da integridade mitocondrial, sugerindo que o efeito protetor do PoCI pode ser resultado de uma redução na resposta inflamatória. No entanto, poucos estudos avaliaram diretamente o impacto do PoCI sobre a inflamação. O PoCI pode limitar a expressão de P-selectina, o que é necessário para rolamento de neutrófilos e seu recrutamento. Além disso, pode reduzir o acúmulo de neutrófilos na região afetada, diminuir a adesão ao endotélio vascular isquêmico, e atenuar a disfunção endotelial do vaso

comprometido, eventos que normalmente ocorrem na I/R (JIVRAJ; LIEW; MARBER, 2015).

Já é bem demonstrada na literatura a eficácia do PrCI na prevenção da lesão de reperfusão. Embora tenhamos defendido aqui a impossibilidade de sua utilização na I/R mesentérica, com exceção do transplante intestinal, muitos autores tem buscado nos conhecimentos da fisiopatologia do PrCI possíveis justificativas para a eficácia do PoCI, postulando que alguns mecanismos poderiam ser semelhantes. Assim como ocorre no PrCI, também o mecanismo de proteção do PoCI parece convergir para a mitocôndria, em particular na permeabilidade de seus poros de transição, que se abrem nos primeiros minutos de reperfusão em resposta ao acúmulo de cálcio intracelular, estresse oxidativo e depleção de trifosfato de adenosina. Tanto o PrCI quanto o PoCI reduzem a abertura dos poros mitocondriais, diminuindo os níveis extracelulares de metabólitos nocivos como o lactato (KALOGERIS; BAO; KORTHUIS, 2014).

Na reperfusão, as enzimas mitocondriais convertem oxigênio em radical superóxido ou em seu derivado, peróxido de hidrogênio. O evento chave do PrCI e PoCI e que contribuiria para a eficácia de ambos pode ser o prolongamento da acidose celular durante a fase inicial da reperfusão. É sabido que a normalização tardia do pH age inibindo a abertura dos poros de transição mitocondrial nos primeiros minutos da reperfusão, assim permitindo tempo para ativação do programa de sobrevivência celular induzido pelas ERTOS. A formação de ERTOS nos primeiros minutos de acidose da reperfusão ou nos curtos ciclos de reperfusão do PoCI ativa isoformas de KPC (proteinoquinase C), quinases fundamentais na cascata de sinalização que agem para reduzir a probabilidade de abertura dos poros mitocondriais após normalização do pH durante a progressão da reperfusão (KALOGERIS; BAO; KORTHUIS, 2014).

Entre todos os órgãos internos, o intestino é provavelmente o mais sensível à I/R. A reperfusão do intestino após um período de isquemia é uma situação comum depois de eventos como o choque, cirurgia vascular e transplante de intestino delgado. Em adição aos danos causados pela isquemia, mais dano tecidual é causado pela produção de ERTOS. A infiltração de neutrófilos e a apoptose do epitélio intestinal ocorrem provavelmente como consequência do aumento destas substâncias, levando a perda da integridade física da barreira mucosa, edema

tecidual e dano a órgãos distantes que também sofrem a lesão de reperfusão (CHU *et al.*, 2015).

Além disso, surgiram algumas situações em que não houve eficácia do PoCI, como no estudo de Schwartz e Lagranha em 2006, não se demonstrando benefício no seu emprego na I/R miocárdica em porcos. Também no estudo de Bretz *et al.* (2010), cujo objetivo era determinar se o PoCI poderia realmente atenuar a injúria intestinal causada pelo processo de I/R. Avaliaram coelhos, que foram distribuídos em grupo controle, grupo I/R e grupo I/R com PoCI. A isquemia teve duração de 45 minutos pela oclusão da artéria jejunal, seguida de duas horas de reperfusão. O PoCI foi realizado com quatro ciclos de 30 segundos de reperfusão e 30 segundos de reoclusão, durante os quatro minutos iniciais da reperfusão. Ao final desta fase, segmentos do intestino foram colhidos e os animais submetidos a eutanásia. A avaliação histopatológica semiquantitativa foi realizada por um único observador e não houve diferença significativa no grau de necrose entre os grupos.

Também Nakamura *et al.* (2014) não evidenciaram benefício no emprego do PoCI utilizando cinco ciclos com duração de 30 segundos cada, de modo bastante parecido com a publicação de Bretz *et al.* (2010), podendo-se inferir que talvez um número maior de ciclos com duração curta não exerça o efeito protetor esperado com o PoCI.

Manintveld *et al.* (2007) observaram que o PoCI não só não conseguiu reduzir o tamanho do enfarte, mas também aumentou a área de lesão num modelo de I/R coronariana de ratos, após 30 minutos de isquemia.

De forma contrastante, Rosero *et al.* (2014) avaliaram recentemente três diferentes protocolos de PoCI em ratos submetidos a I/R mesentérica, e observaram que ciclos curtos ofereceram mais proteção contra a lesão de reperfusão. Utilizaram 60 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão, ou seja, períodos diferentes dos adotados nos dois estudos acima citados, o que poderia justificar os resultados conflitantes.

Sengul *et al.* (2013) também demonstraram melhores resultados com ciclos curtos de PoCI. Eles utilizaram três e seis ciclos de PoCI com duração de 10 segundos cada em ratos submetidos a I/R mesentérica e obtiveram melhores resultados com seis ciclos, mas ambos os grupos tiveram vantagem em relação ao grupo controle.

Chu *et al.* (2015) observaram efeito protetor do PoCI em ratos submetidos a I/R mesentérica, tanto quanto com o PrCI. A isquemia foi realizada durante 45 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial e a reperfusão por uma hora. O PoCI foi realizado por três ciclos de 30 segundos cada, demonstrando também a eficácia do método com a utilização de ciclos curtos.

Os resultados aqui obtidos são relativamente conflitantes com estas publicações, uma vez que não se observou no presente estudo diferença de proteção do PoCI entre ciclos mais demorados com ciclos mais curtos. Deve-se salientar, entretanto, que os tempos de I/R utilizados foram diferentes dos por nós empregados comparando-se com os artigos acima citados, o que poderia prejudicar a interpretação.

Vinten-Johansen *et al.* já haviam sugerido em 2005 que na I/R miocárdica, PoCI com ciclos curtos teriam maior eficácia, propondo 30 segundos para cães e 10 segundos para ratos, com base no que a literatura mostrava naquele momento. Aqui cabe uma consideração importante em relação ao órgão estudado, uma vez que aquilo que se mostra eficaz para o coração pode não ser para o intestino. Além disso, outros estudos com tempos maiores demonstraram em sua maioria resultados semelhantes quanto à eficácia do PoCI. O presente estudo é exemplo disso, uma vez que não houve diferença na capacidade de minimizar as lesões de reperfusão entre os grupos PoCI-1 e PoCI-2.

A duração da isquemia desempenha um papel crucial na eficácia do PoCI. Uma revisão sistemática sobre o uso do PoCI na I/R (SKYSCHALLY *et al.*, 2009) demonstrou que quando a isquemia é aplicada por período superior a 60 minutos em modelos de ratos há uma redução muito branda da área de infarto com o PoCI e, por outro lado, períodos de isquemia entre 30 e 45 minutos permitem uma maior eficácia do método. Por este motivo utilizou-se aqui 30 minutos de isquemia, também acompanhando outras publicações que adotaram de modo eficaz este método.

Os algoritmos usados para o PoCI consistem principalmente em três elementos variáveis que podem afetar a sua eficácia: a duração da fase de isquemia; o número de ciclos de PoCI e sua duração; e a duração da fase de reperfusão após aplicação do PoCI.

A duração e o número de ciclos de PoCI tem um impacto claro sobre a lesão de reperfusão. Por exemplo, a duplicação do número de ciclos de três para seis, em ratos, e de quatro para oito em suínos, permitiu uma redução significativa da

dimensão do enfarte (JIVRAJ; LIEW; MARBER, 2015). Assim, optou-se aqui também por esta comparação entre dois e quatro ciclos de PoCI, não havendo diferença na eficácia, devendo-se destacar, entretanto, que a duração dos ciclos foi diferente. Aqueles autores também informaram que o aumento da duração do ciclo de 10 para 30 segundos permitiu melhor resposta do PoCI, enquanto que na presente pesquisa não houve diferença entre os ciclos de dois minutos e 30 segundos.

Skychally *et al.* (2009) também acreditam que poucos ciclos ou duração muito curta dos mesmos podem resultar em ineficácia do método, argumentando também que uma fase de isquemia no PoCI muito longa pode agravar a lesão. Observaram que ratos e outros animais de pequeno porte necessitam duração dos ciclos de PoCI de cinco a 10 segundos, enquanto que os animais maiores requerem 30 a 60 segundos, e diversos ensaios humanos têm utilizado períodos de um a cinco minutos. De modo oposto, observou-se nesta pesquisa com ratos que ciclos variando de 30 segundos a dois minutos foram igualmente eficazes em prevenir as lesões de reperfusão. Há que se considerar, no entanto, que provavelmente existem diferenças entre os órgãos estudados, pois as informações obtidas na revisão sistemática de Skychally *et al.* (2009) contém em sua grande maioria estudos de I/R miocárdica, e estes resultados podem não ser aplicáveis à lesão intestinal.

Coskunfirat *et al.* (2014) também tiveram interesse em verificar o melhor método de emprego do PoCI em retalhos cutâneos, igualmente argumentando quanto a multiplicidade de métodos existentes na literatura. Após seis horas de isquemia do retalho cutâneo em ratos Wistar avaliaram o PoCI com seis ciclos de R/I, com períodos de 15, 30 e 60 segundos. Constataram que o melhor resultado foi obtido com seis ciclos de 30 segundos, achado contraditório à colocação de Skychally *et al.* (2009) que afirmaram que para ratos o ideal seria PoCI de até 10 segundos.

Outro fator a ser considerado na análise da grande variedade de resultados obtidos com o emprego do PoCI, levando-se em conta as diferenças no método, é a idade dos animais. Yin *et al.* (2009) observaram que o tamanho do enfarto foi reduzido em ratos com 18 meses de idade com o PoCI, mas não houve a mesma proteção nos animais com 20 a 24 meses de idade. No entanto, o aumento do número de ciclos de PoCI nos ratos mais velhos promoveu efeito cardioprotetor. Ou seja, o benefício de mais ciclos de PoCI pode estar relacionado à idade dos animais

e condições dos vasos e órgãos. Os animais aqui utilizados tinham até quatro meses de vida.

Assim, analisando-se as publicações aqui colocadas, pode-se observar que muitos avanços tem ocorrido no conhecimento da fisiopatologia do processo de I/R e os efeitos que o PoCI promove aos diversos tecidos submetidos a ele, geralmente descrevendo seu papel protetor à lesão de reperfusão local e à distância. À medida que passamos a conhecer os processos bioquímicos no nível intracelular decorrentes da I/R e as mudanças causadas pela interposição do PoCI, pode-se tornar mais claro o método ideal de aplicação deste último para que a prevenção da lesão de reperfusão ocorra com maior eficácia, levando-se em conta o órgão estudado, o animal e a duração da isquemia que antecede sua aplicação.

Se por um lado predominam as publicações que demonstram o benefício do PoCI frente a diversas situações de I/R, existem estudos onde estes resultados não foram confirmados, surgindo questões a serem respondidas quanto aos motivos de tais divergências, provavelmente relacionadas às diferenças no método de sua aplicação.

No estudo da repercussão da I/R mesentérica sobre o fígado, observou-se resultados diferentes do que foi demonstrado em relação ao intestino e ao pulmão. Numa classificação histológica cujo grau zero é tecido normal, até o grau três, quando ocorre lesão mais intensa (TAKEDA *et al.*, 2003), poderíamos dizer que se obteve lesão moderada na presente pesquisa, já que a média do grupo controle foi 1,8. Ou seja, há uma diferença entre pulmão e fígado quanto a sua resistência aos produtos da I/R mesentérica, uma vez que os períodos utilizados para I/R foram os mesmos e os achados histológicos diferentes. Esta divergência é até certo ponto esperada, ou pelo menos de fácil compreensão, uma vez que o fígado é o primeiro órgão a receber todo o sangue oriundo do intestino no momento em que se dá a reperfusão, já que a veia mesentérica cranial drena o sangue intestinal inteiramente para o fígado.

Obteve-se, portanto, lesão moderada no fígado dos ratos submetidos a 30 e 60 minutos de I/R mesentérica, podendo-se aqui analisar o efeito do PoCI como mecanismo de proteção. Como apresentado nos resultados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, PoCI-1 e PoCI-2, demonstrando que neste modelo o PoCI foi ineficaz.

Yoon *et al.* (2015) estudaram o efeito do PoCI na I/R hepática e observaram que este promoveu proteção. Porém, estes autores aplicaram o processo de I/R diretamente no hilo hepático, além de utilizarem períodos superiores aos aqui aplicados, 60 e 120 minutos de I/R, respectivamente. O mesmo resultado foi obtido na pesquisa de Santos *et al.* (2010), também realizando clampeamento do hilo hepático para o processo de I/R, utilizando-se três ciclos de PoCI com duração de 30 segundos, demonstrando-se assim a eficácia do método quando o PoCI é realizado em ratos submetidos a I/R diretamente sobre o fígado.

Muitos autores tem alcançado proteção com o uso do PoCI quando a I/R ocorrem diretamente no hilo hepático (THEODORAKI *et al.*, 2016), o que permitiu que sua eficácia fosse testada também em seres humanos. Ricca *et al.* (2015) verificaram a ação do PoCI em indivíduos submetidos a transplante hepático, por meio de três ciclos de uma hora de reperfusão intercalados com três ciclos de um minuto de oclusão arterial imediatamente após a reperfusão do enxerto. Valores de pico de AST no pós-operatório, com mediana de índices de disfunção precoce do enxerto, a apoptose, a morbidade (incluindo a rejeição ao enxerto) e a mortalidade pós-operatória precoce foram semelhantes entre os pacientes submetidos ao PoCI e o grupo controle. No entanto, os enxertos submetidos ao PoCI apresentaram lesões histopatológicas menos graves do que o grupo controle. Novamente observou-se, portanto, benefício com utilização do PoCI com I/R hepática, diferentemente do método avaliado na presente pesquisa onde se pesquisou o efeito remoto na I/R mesentérica.

O PoCI permitiria uma menor lesão hepática frente ao processo direto de I/R devido a uma discreta atividade na prevenção da hiperoxigenação de fosfolípidos mitocondriais, e, principalmente, por apresentar grande influência na redução da apoptose e necrose celular após lesão de reperfusão (YOON *et al.*, 2015). Como não se observou a mesma eficácia na presente pesquisa, pode-se imaginar que na lesão remota isto talvez não ocorra ou que o método aplicado (número de ciclos e duração dos mesmos no PoCI) possa influenciar neste resultado.

Quanto à sua eficácia na lesão remota, pode-se destacar a publicação de Seifi *et al.* (2014) que avaliaram o efeito protetor do PoCI na lesão hepática após I/R renal. Ratos foram submetidos a isquemia renal por 45 minutos e o PoCI foi realizado por quatro ciclos de R/I com duração de 10 segundos cada. Observou-se que a I/R renal causou um aumento significativo nos índices funcionais do fígado

como o aumento das transaminases, enquanto que estes parâmetros foram reduzidos significativamente no grupo do PoCI, além de induzir a redução dos níveis de malondialdeído no fígado e aumento da atividade da superóxido dismutase. Comparando-se então estes resultados com os da presente pesquisa, poder-se-ia justificar os resultados conflitantes pelas diferenças no método. Em primeiro lugar, o órgão submetido à I/R foi o rim e não o intestino, além do que os tempos de I/R bem como dos ciclos de PoCI diferem completamente, inviabilizando a tomada de conclusões por não ser possível comparar situações tão diversas.

Num estudo empregando o PoCI após I/R mesentérica e avaliação hepática, Onody *et al.* (2012) demonstraram a eficácia do método. Utilizaram, porém, 60 minutos de isquemia e seis horas de reperfusão, períodos bastante superiores aos aqui aplicados. Além disso, dificulta a comparação com a presente pesquisa o meio de avaliação da lesão, já que estes autores não fizeram análise histológica, mas sim laboratorial.

Costa *et al.* (2016) avaliaram a eficácia à distância do PoCI em ratos submetidos a I/R da pata traseira. O procedimento foi feito por 30 minutos, sendo três ciclos de reperfusão de cinco minutos intercalados por três ciclos de cinco minutos de isquemia. Retiraram o fígado e rins para análise tecidual aos 10 e 60 minutos após a conclusão do PoCI, comprovando haver efeito anti-oxidante em ambas as amostras quando comparadas ao grupo controle. Uma vez mais, deve-se salientar a grande diferença no método aqui aplicado em comparação ao presente estudo.

Há uma escassez de artigos dedicados à análise do efeito sobre o fígado de animais submetidos a I/R de outros órgãos, e, até o presente momento, nenhuma outra publicação em que se tenha realizado I/R mesentérica além da de Onody *et al.* (2012). Assim, cabe-nos analisar aqui possíveis justificativas para a falha do PoCI neste modelo de I/R, uma vez que na maioria das situações em que este método tem sido utilizado seu resultado é favorável no que se refere a prevenção da lesão de reperfusão, seja local ou à distância.

Como demonstrado em muitas publicações, o PoCI é eficaz na I/R miocárdica, mas vários breves períodos de perfusão e reoclusão são necessários para este efeito protetor (SIMON, 2014). No cérebro, este é capaz de minimizar os efeitos da reperfusão em muitos estudos, mas já há evidências de falha a depender do método empregado (LEE *et al.*, 2015). Estas observações indicam que há grande variação

na resposta ao PoCI entre os vários órgãos estudados. Além disso, períodos variáveis de isquemia antecedendo a aplicação do PoCI também influenciam na sua eficácia e, de grande importância, o número e duração dos ciclos de R/I utilizados no PoCI.

O pico de produção de ERTO ocorre entre o primeiro e o sétimo minuto após o início da reperfusão, embora sejam detectáveis tais substâncias em períodos mais tardios. Uma produção abundante de ERTO durante essa fase inicial da reperfusão tem sido implicada como o principal fator na patogênese da injúria tecidual. O PoCI age nesta fase, de modo ainda não totalmente esclarecido, provavelmente atenuando a produção de ERTO pela liberação gradativa de oxigênio aos tecidos (JIANG *et al.*, 2016). Assim, o PoCI deveria supostamente diminuir também as lesões à distância, como no caso do fígado. Entretanto, devemos considerar que ainda há muito o que descobriremos tanto em relação à fisiopatologia do processo quanto a respeito dos muitos mecanismos empregados na prevenção da lesão de reperfusão. Pode-se cogitar que pelo fato do fígado ser o órgão a receber toda a drenagem venosa intestinal e, conseqüentemente, a maior parte da produção de ERTO, haveria maior dificuldade em minimizar as lesões de reperfusão. Porém, não há evidência que confirme tal hipótese, e como faltam estudos com desenho semelhante ao aqui empregado, deve-se aguardar que outras pesquisas utilizando o PoCI com número de ciclos e duração dos mesmos diferentes dos aqui utilizados sejam feitos para se confirmar a ineficácia do método ou seu eventual benefício sobre o fígado no processo de I/R mesentérica.

O processo de I/R intestinal pode causar grave lesão tecidual e aumento da permeabilidade intestinal, a depender do tempo e intensidade deste processo. He *et al.* (2015) demonstraram que ocorrem mudanças morfológicas como injúria mucosa, erosão vilosa, necrose, congestão intersticial na lâmina própria, edema, inflamação e hemorragia submucosa. Este aumento da permeabilidade intestinal leva à translocação bacteriana, o que pode contribuir para uma resposta inflamatória sistêmica mediada por citocinas. A proteína HMGB1 (*High-mobility group box 1*) é um ligante endógeno que desempenha importante papel neste processo e tem relação direta com a sepse e aumento da letalidade. Na I/R, nos estágios iniciais, há aumento imediato da HMGB1 que continua se elevando lentamente durante a reperfusão e pode levar ao acúmulo de neutrófilos e edema pulmonar (IDROVO *et al.*, 2014).

Além das citocinas, a ativação do sistema imunológico pelo intestino isquemiado produz TNF- α , e IL-6. A resposta inflamatória sistêmica após I/R ativa neutrófilos, que são sequestrados na microcirculação pulmonar com o consequente aumento da permeabilidade endotelial e epitelial, extravazamento de fluidos e proteínas, sequestro de leucócitos e aumento da injúria no endotélio dos capilares pulmonares (IDROVO *et al.*, 2014). Certamente este processo será mais intenso e danoso à medida que a I/R tenham maior duração, resultando em maior permeabilidade intestinal e maior processo inflamatório local e remoto. Isto poderia justificar o fato de que no presente estudo observou-se lesão pulmonar leve, enquanto outras publicações utilizando maiores períodos de I/R demonstraram maior dano pulmonar.

Tal fato foi observado na publicação de Guido *et al.* (2013) na qual os autores realizaram isquemia por 45 minutos e reperfusão por duas e 24 horas, constatando lesão pulmonar à histologia de moderada a intensa. Os autores observaram que o período de reperfusão é um fator crucial para o surgimento da lesão à distância, em especial a pulmonar, o que ficou demonstrado pelo menor acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar após duas horas de reperfusão em comparação com 24 horas, quando houve maior concentração destas células. Esta poderia ser também outra explicação para o desenvolvimento de lesão pulmonar leve na presente pesquisa, já que a reperfusão teve duração de apenas 60 minutos.

Utilizando 30 minutos de isquemia e três horas de reperfusão, Lapchak *et al.* (2012) não demonstraram diferença estatística na concentração de neutrófilos no pulmão de ratos submetidos a I/R mesentérica, comparando-se ao grupo SHAM, o que pode estar relacionado a um período menor de isquemia do que em outras publicações em que se observou maior concentração neutrofílica. Este resultado está de acordo com o encontrado na presente pesquisa, embora tenha-se utilizado nesta um período de reperfusão ainda menor, demonstrando que em ratos, 30 minutos de isquemia e 60 a 180 minutos de reperfusão são insuficientes para produzir dano intenso ao pulmão.

Vários estudos tem confirmado a presença de lesão pulmonar após I/R, como é o caso da publicação de Wang *et al.* (2013) em que os autores aplicaram I/R mesentérica durante 60 e 120 minutos, respectivamente, observando lesão pulmonar moderada. Ou seja, utilizaram o dobro de tempo do presente estudo, alcançando então lesão moderada nos pulmões. Comparando-se com a publicação

de Lapchak *et al.* (2012) deu-se o mesmo, apesar destes últimos terem utilizado reperfusão com duração de 180 minutos, mas a isquemia com apenas metade do tempo daquele de Wang *et al.* (2013). Pode-se inferir que uma isquemia mais prolongada pode gerar maior efeito deletério pulmonar à reperfusão. Corroborando com este raciocínio, Sotoudeh *et al.* (2012) também obtiveram grau moderado de lesão pulmonar em estudo no qual realizaram isquemia por duas horas da artéria femoral de ratos com reperfusão de 24 horas.

He *et al.* (2015) obtiveram média 2,5 de lesão pulmonar utilizando a classificação proposta por Sizlan *et al.* (2009) com a I/R intestinal. Estes autores utilizaram ratos Sprague-Dawley com períodos de I/R superiores aos aqui empregados, 45 e 120 minutos, respectivamente. Utilizando-se da mesma classificação histológica, na presente pesquisa obteve-se média um de lesão pulmonar nos ratos submetidos a I/R mesentérica, podendo-se novamente justificar tal diferença de resultados pelos períodos de I/R.

Também Idrovo *et al.* (2014) observaram lesão pulmonar moderada a intensa na análise histológica de ratos submetidos a I/R intestinal, porém, com 90 minutos de isquemia e quatro horas de reperfusão, superiores, portanto, quando comparados aos aqui empregados.

Como obteve-se lesão pulmonar leve no presente estudo, demonstrando que em ratos Wistar, 30 e 60 minutos de I/R mesentérica não são suficientes para causar maior dano aos pulmões, não foi possível verificar a capacidade do PoCI de minimizar ou prevenir a lesão de reperfusão neste órgão. Thomaz Neto *et al.* (2013) já haviam demonstrado que o processo de I/R mesentérica causa lesão pulmonar leve, e mesmo assim afirmaram que o PrCI pode minimizar tal lesão. Embora estes autores tenham publicado que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, não deixaram claros os valores obtidos como médias de lesão pulmonar. Também Stringa *et al.* (2016) demonstraram a eficácia do PrCI na prevenção de lesão pulmonar em ratos submetidos a I/R mesentérica, tanto na análise histológica quanto por parâmetros bioquímicos. Entretanto, mesmo considerando-se que o PrCI seja capaz de minimizar a lesão remota sobre os pulmões, este método de prevenção tem pouca aplicabilidade clínica, uma vez que ao se identificar a isquemia mesentérica já não há mais oportunidade para sua utilização. Por outro lado, o PoCI teria maior aplicabilidade, por ser utilizado após o diagnóstico da isquemia intestinal instalada, uma vez que este tem se mostrado eficaz na prevenção ou diminuição da

lesão de reperfusão em vários órgãos estudados, inclusive o intestino (SANTOS *et al.*, 2009). Entretanto, apesar da sua comprovada eficácia local, não há na literatura científica estudada a avaliação do PoCI na prevenção de lesão pulmonar no processo de I/R mesentérica. Como no presente estudo não houve diferença entre o grupo submetido apenas à I/R e os dois grupos tratados pelo PoCI, não foi possível verificar se este método seria capaz de prever ou minimizar tais lesões.

Recentemente, Dorsa *et al.* (2015) demonstraram efeito protetor do PoCI no pulmão de ratos submetidos a I/R. De modo semelhante à presente pesquisa, estes autores usaram também 30 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão, porém, por oclusão da aorta. Como resultado, obtiveram lesão pulmonar intensa no grupo controle e leve no grupo PoCI, utilizando outra avaliação histológica que não a de Sizlan *et al.* (2009). A maior diferença observada, portanto, em comparação com a presente pesquisa foi quanto ao achado de lesão intensa com clampeamento aórtico enquanto observou-se aqui lesão leve com oclusão da artéria mesentérica cranial, sugerindo que o tempo de I/R não é o único fator que acarreta lesão à distância como observado em outras publicações, mas também qual artéria é ocluída exerce influência direta no desenvolvimento da lesão de reperfusão. O clampeamento aórtico realizado acima das artérias renais, como na pesquisa de Dorsa *et al.* (2015) provavelmente compromete uma maior extensão de órgãos e tecidos, levando assim a uma maior produção de fatores deletérios na circulação sistêmica, enquanto que num mesmo período, a I/R exclusivamente intestinal, embora cause dano expressivo a este órgão, não é suficiente para promover grave lesão pulmonar.

A resposta inflamatória sistêmica na I/R mesentérica representa um modelo importante de doença grave, pois hipóxia na mucosa intestinal parece ser um fator desencadeante crítico na iniciação e propagação da falência de múltiplos órgãos (FERRARI; ANDRADE, 2016). Isto tem sido observado em muitos dos artigos em que se confirmou lesão moderada a grave no parênquima pulmonar dos animais submetidos a I/R mesentérica, a depender do tempo de aplicação.

Os mecanismos de lesão de I/R no parênquima pulmonar são semelhantes a reperfusão em outros órgãos e incluem um envolvimento significativo de ERT0, influxo de cálcio intracelular, lesão da célula endotelial, sequestro de leucócitos, ativação do sistema de complemento, e a liberação de mediadores inflamatórios, tais como metabólitos do ácido araquidônico. Isto ocorre principalmente em vênulas pós-

capilares, aumentando a pressão hidrostática, e favorecendo a formação de edema, o que é facilitado pelo aumento da permeabilidade capilar causada por lesão endotelial. As ERTOs têm um papel chave no desenvolvimento de lesões pulmonares, com um papel crucial na sequência de eventos que levam à insuficiência pulmonar (FERRARI; ANDRADE, 2016).

Comprovada a existência de lesão pulmonar em diversos processos de I/R distantes, torna-se fundamental estabelecer meios de prevenir ou minimizar tal efeito. O emprego do PrCl, como vimos em algumas pesquisas, pouco contribui para uma situação específica como a isquemia mesentérica instalada, pois não seria possível aplicá-lo, tornando de grande interesse a avaliação do PoCl. Entretanto, como não existem pesquisas até este momento com propósito de avaliar a lesão pulmonar na I/R mesentérica, não estão também estabelecidos quais períodos de I/R devem ser utilizados para este fim. Assim, se a presente pesquisa não pode avaliar a eficácia do PoCl na prevenção de tal lesão, já que esta não ocorreu com a intensidade necessária, por outro lado deixou demonstrado que 30 e 60 minutos de I/R, respectivamente, causam apenas lesão pulmonar leve. É possível que o pulmão possa resistir mais do que o órgão primário submetido à I/R, já que estes períodos de I/R causam lesão considerável ao intestino.

Os resultados aqui apresentados deixam-nos algumas importantes mensagens. Quanto ao efeito do PoCl na I/R mesentérica, deve-se destacar em primeiro lugar que os resultados obtidos reforçam a ideia de que o PoCl é realmente um método eficaz na diminuição da lesão intestinal de reperfusão frente à I/R mesentérica. Segundo, que com o método aqui empregado e em ratos, não houve diferença entre fazer-se dois ciclos de R/I com duração de dois minutos ou quatro ciclos com duração de 30 segundos. Em relação à lesão remota no fígado observou-se que este mesmo modelo de I/R causou lesão moderada. O porquê desta diferença em relação ao pulmão já abre inúmeras possibilidades de estudo, por várias hipóteses possíveis, algumas delas aqui levantadas. Havendo lesão, o PoCl pode ser analisado, mas não demonstrou proteção. Num universo de publicações predominantemente favoráveis ao PoCl como método de prevenção da lesão de reperfusão, a identificação de uma situação em que isto não se observa leva também a muitas reflexões e desperta o interesse para o aprofundamento do estudo. Por fim, este modelo de I/R mesentérica com duração de 30 e 60 minutos, respectivamente, produziu apenas lesão pulmonar leve. Embora este achado tenha

inviabilizado a avaliação do PoCI na prevenção de lesão pulmonar remota, fica aqui a contribuição de que estes períodos não são suficientes para desenvolver lesões mais intensas, sendo esta uma informação útil a novas pesquisas. Isto significa que devemos caminhar para uma padronização de métodos de desenvolvimento da lesão de reperfusão experimental para posteriormente descobrirmos se há ou não diferença na eficácia do PoCI com as variações de ciclos e duração dos mesmos.

7 CONCLUSÃO

O pós-condicionamento isquêmico foi capaz de diminuir a lesão diretamente produzida sobre o intestino, tanto com dois ciclos de dois minutos quanto com quatro ciclos de 30 segundos, porém, não foi capaz de diminuir as lesões à distância no fígado dos animais submetidos à I/R mesentérica. Não foi possível avaliar a eficácia do PoCI nos pulmões uma vez que o método de I/R aqui utilizado causou lesão leve neste órgão.

REFERÊNCIAS

- AAKHUS, T. The value of angiography in superior mesenteric artery embolism. **The British Journal of Radiology**, v. 39, n. 468, p. 928-932, Dec. 1966.
- AKDOGAN, R. A.; KALKAN, Y.; TUMKAYA, L.; ALACAM, H.; EERDIVANLI, B.; AYDIN, İ. Influence of infliximab pretreatment on ischemia/reperfusion injury in rat intestine. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 52, n. 1, p. 36-41, May 2014.
- ARISUE, A.; SHIMOJIMA, N.; TOMIYA, M.; SHIMIZU, T.; HARADA, D.; NAKAYAMA, M.; MORIKAWA, Y. Effect of an omega-3 lipid emulsion in reducing oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. **Pediatric Surgery International**, v. 28, n. 9, p. 913–918, Sept. 2012.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, fev. 2006.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; GRECA, F. H.; IOSHI, S.; TAWIL, I. I. E.; MENINI, C. M.; RAMPAZZO, J. C. The influence of antibiotics on intestinal ischemia and reperfusion: experimental study in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 83-87, 2000.
- BOLEY, S. J.; BRANDT, L. J.; SAMMARTANO, R. J. History of mesenteric ischemia: The evaluation of a diagnosis and management. **The Surgical Clinics of North America**, v. 77, n.2, p. 275-288, Apr. 1997.
- BRETZ, B.; BLAZE, C.; PARRY, N.; KUDEJ, R. K. Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 2, p. 216-223, Feb. 2010.
- CALEB, M. G. Acute bowel ischemia after coronary bypass surgery – a catastrophic event. **Singapore Medical Journal**, v. 12, n. 1, p. 33-37, Jan. 2001.
- CÁMARA, C. R.; GUZMÁN, F. J.; BARRERA, E. A.; CABELLO, A. J.; GARCIA, A.; FERNÁNDEZ, N. E.; ANCER, J. Ketamine anesthesia reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 33, p. 5192-5196, Sept. 2008.
- CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 255-266, Feb. 2000.
- CARDOZO, F. S. **Efeitos terapêuticos do exercício físico em modelo animal de artrite**. 2008. 49 f. Monografia (Especialização em Fisiologia do Exercício) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.
- CASTRO e SILVA Jr., O.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 96-100, 2002.

CERQUEIRA, N. F.; HUSSNI, C. A.; YOSHIDA, W. B. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 336-343, July/Aug. 2005.

CERQUEIRA, N. F.; HUSSNI, C. A.; YOSHIDA, W. B.; SEQUEIRA J. L.; PADOVANI, C. R. Effects of pentoxifylline and n-acetylcysteine on injuries caused by ischemia and reperfusion of splanchnic organs in rats. **International Angiology**, v. 27, n. 6, p. 512-521, Dec. 2008.

CHO, S. S. C.; RUDLOFF, I.; BERGER, P. J.; IRWIN, M. G.; NOLD, M. F.; CHENG, W.; NOLD-PETRY, C. A. Remifentanil ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury. **BMC Gastroenterology**, v. 13, Apr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3639835/>>. Acesso em: 22 abr.2016.

CHIU, C. J.; McARDLE, A. H.; BROWN, R.; SCOTT, H. J.; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. **Archives of Surgery**, v. 101, n. 4, p. 478-483, Oct. 1970.

CHU, M. J. J.; VATHER, R.; HICKEY, A. J. R.; PHILLIPS, A. R. J.; BARTLETT, A. S. J. R. Impact of ischemic preconditioning on outcome in clinical liver surgery: a systematic review. **BioMed Research International**, Feb. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4338382/>>. Acesso em: 21 abr.2016.

CHU, W.; LI, S.; WANG, S.; YAN, A.; NIE, L. Ischemic postconditioning provides protection against ischemia-reperfusion injury in intestines of rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 6, p. 6474-6481, Jun. 2015.

COSKUNFIRAT, O. K.; CINPOLAT, A.; BEKTAS, G.; OGAN, O.; TANER, T. Comparing different postconditioning cycles after ischemia reperfusion injury in the rat skin flap. **Annals of Plastic Surgery**, v. 72, n. 1, p. 104-107, Jan. 2014.

COSTA, F. L.; TEIXEIRA, R. K.; YAMAKI, V. N.; VALENTE, A. L.; SILVA, A. M.; BRITO, M. V.; PERCARIO, S. Remote ischemic conditioning temporarily improves antioxidant defense. **The Journal of Surgical Research**, v. 200, n. 1, p. 105-109, Jan. 2016.

COSTA, J. F.; FONTES-CARVALHO, R.; LEITE-MOREIRA, A. F. Pré-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio: dos mecanismos fisiopatológicos à aplicação na prática clínica. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 32, n. 11, p. 893-904, nov. 2013.

COUVREUR, N.; LUCATS, L.; TISSIER, R.; BIZE, A.; BERDEAUX, A.; GHALEH, B. Differential effects of postconditioning on myocardial stunning and infarction: a study in conscious dogs and anesthetized rabbits. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. 1345-1350, Sept. 2006.

CRIMI, G.; PICA, S.; RAINERI, C.; BRAMUCCI, E.; FERRARI, G. M.; KLERSY, C.; FERLINI, M.; MARINONI, B.; REPETTO, A.; ROMEO, M.; ROSTI, V.; MASSA, M.; RAISARO, A.; LEONARDI, S.; RUBARTELLI, P.; VISCONTI, L. O.; FERRARIO, M.

Remote ischemic post-conditioning of the lower limb during primary percutaneous coronary intervention safely reduces enzymatic infarct size in anterior myocardial infarction: a randomized controlled trial. **JACC Cardiovascular Interventions**, v. 6, n. 10, p. 1055–1063, Oct. 2013.

CSEREPES, B.; JANCSÓ, G.; GASZ, B.; RÁCZ, B.; FERENC, A.; BENKÓ, L.; BORSICZKY, B.; KÜRTHY, M.; FERENCZ, S.; LANTOS, J.; GÁL, J.; ARATÓ, E.; MISETA, A.; WÉBER, G.; RÓTH, E. Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, n. 1, p. 228-239, Jan. 2007.

DARLING, C. E.; SOLARI, P. B.; SMITH, C. S.; FURMAN, M. I.; PRYKLENK, K. "Postconditioning" the human heart: multiple balloon inflations during primary angioplasty may confer cardioprotection. **Basic Research in Cardiology**, v. 102, n. 3, p. 274-278, May 2007.

DEFTEREOS, S.; GIANNOPOULOS, G.; TZALAMOURAS, V.; RAISAKIS, K.; KOSSYVAKIS, C.; KAOUKIS, A.; PANAGOPOULOU, V.; KARAGEORGIU, S.; AVRAMIDES, D.; TOUTOUZAS, K.; HAHALIS, G.; PYRGAKIS, V.; MANOLIS, A. S.; ALEXOPOULOS, D.; STEFANADIS, C.; CLEMAN, M. W. Renoprotective effect of remote ischemic post-conditioning by intermittent balloon inflations in patients undergoing percutaneous coronary intervention. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 61, n. 19, p. 1949–1955, May 2013.

DICKSON, E. W.; TUBBS, R. J.; PORCARO, W. A.; LEE, W. J.; BLEHAR, D. J.; CARRAWAY, R. E.; DARLING, C. E.; PRZYKLENK, K. Myocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K_{ATP} channels. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 1, p. 22-28, July 2002.

DIWAN, V.; JAGGI, A. S.; SINGH, M.; SINGH, N.; SINGH, D. Possible involvement of erythropoietin in remote renal preconditioning-induced cardioprotection in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 126–130, Feb. 2008.

DORSA, R. C.; PONTES, J. C. D. V.; ANTONIOLLI, A. C. B.; SILVA, G. V.; BENFATTI, R. A.; SANTOS, C. H. M.; PONTES, E. R.; GOLDIANO, J. A. Effect of remote ischemic postconditioning in inflammatory changes of the lung parenchyma of rats submitted to ischemia and reperfusion. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 30, n. 3, p. 353-359, jul./set. 2015.

ELLIOT, J. W. The operative relief of gangrene of the intestine due to occlusion of the mesenteric vessels. **Annals of Surgery**, v. 21, n. 1, p. 9-23, Jan. 1895.

ERLING, N.; MONTERO, E. F. S.; SANNOMIYA, P.; POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. Local and remote ischemic preconditioning protect against intestinal ischemic/reperfusion injury after supraceliac aortic clamping. **Clinics**, v. 68, n. 12, p. 1548-1554, Dec. 2013.

EKER, A.; MALZAC, B.; TEBOUL, J.; JOURDAN, J. Mesenteric ischemia after coronary artery bypass grafting: should local continuous intra-arterial perfusion with

papaverine be regarded as a treatment?. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 15, n. 2, p. 218-220, Feb. 1999.

FAN, Z.; YAO, J.; LI, Y.; HU, X.; SHAO, H.; TIAN, X. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF-Kb. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 4, p. 3451-3459, Apr. 2015.

FERRARI, R. S.; ANDRADE, C. F. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, June 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487720/>> Acesso em: 07 Ago.2016.

GARBAISZ, D.; TURÓCZI, Z.; FULOP, A.; ROSERO, O.; ARANYI, P.; ÓNODY, P.; LOTZ, G.; RAKONCZAY, Z.; BALLA, Z.; HARSANYI, L.; SZIJARTO, A. Postconditioning can reduce long-term lung injury after lower limb ischemia-reperfusion. **Magyar sebészet**, v. 66, n. 3, p. 146-154, June 2013.

GUIDO, B. C.; ZANATELLI, M.; TAVARES-DE-LIMA, W.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice. **Journal of Inflammation**, v. 10, n. 1, Mar. 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608250/>> Acesso em: 04 Ago.2016.

GUO, W. H.; CHAN, K. L.; FUNG, P. P. C. W.; CHAN, K. W.; TAM, P. K. H. Nitric oxide protects segmental intestinal grafts from ischemia and reperfusion injury. **Transplantation Proceedings**, v. 32, n. 6, p. 1297-1298, Sept. 2000.

HALLDORSSON, A. O.; KRONON, M. T.; ALLEN, B. S.; RAHMAN, S.; WANG, T. Lowering reperfusion pressure reduces the injury after pulmonary ischemia. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 69, n. 1, p. 198-204, Jan. 2000.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3c, p. 14-22, Sept. 1991.

HAMMERMAN, C.; GOLDSCHMIDT, D.; CAPLAN, M. S.; KAPLAN, M.; SCHIMMEL, M. S.; EIDELMAN, A. I.; BRANSKI, D.; HOCHMAN, A. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 69-74, July 1999.

HANGLUND, U.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N. On the pathophysiology of intestinal ischemic injury. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 153, n. 5-6, p. 321-324, May/June 1987.

HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Remote ischemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. 334-341, June 2009.

HE, X. H.; LI, Q. W.; WANG, Y. L.; ZHANG, Z. Z.; KE, J. J.; YAN, X. T.; CHEN, K.

Transduced PEP-1-heme oxygenase-1 fusion protein reduces remote organ injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 1057-1065, Apr. 2015.

HUANG, H.; ZHANG, L.; WANG, Y.; YAO, J.; WENG, H.; WU, H.; CHEN, Z.; LIU, J. Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemic-reperfusion injury in rabbits. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 54, n. 1, p. 42-48, Jan. 2007.

IDROVO, J. P.; YANG, W. L.; JACOB, A.; AZIZ, M.; NICASTRO, J.; COPPA, G. F.; WANG, P. AICAR attenuates organ injury and inflammatory response after intestinal ischemia and reperfusion. **Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 676-683, Mar. 2014.

JIANG, Q.; YU, T.; HUANG, K.; LU, J.; ZHANG, H.; HU, S. Remote ischemic postconditioning ameliorates the mesenchymal stem cells engraftment in reperfused myocardium. **Public Library of Science One**, v. 11, n. 1, Jan. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4712013/>> Acesso em: 23 abr.2016.

JIANG, Y.; ZHOU, Z.; MENG, Q.; SUN, Q.; SU, W.; LEI, S.; XIA, Z. Ginsenoside Rb1 treatment attenuates pulmonary inflammatory cytokine release and tissue injury following intestinal ischemia reperfusion injury in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. June 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487341/>>. Acesso em: 23 abr.2016.

JIN, Z. X.; ZHOU, J. J.; XIN, M.; PENG, D. R.; WANG, X. M.; BI, S. H.; WEI, X. F.; YI, D. H. Postconditioning the human heart with adenosine in heart valve replacement surgery. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 83, n. 6, p. 2066-2073, June 2007.

JIVRAJ, N.; LIEW, F.; MARBER, M. Ischaemic postconditioning: cardiac protection after the event. **Anaesthesia**, v. 70, n. 5, p. 598-612, May 2015.

KALOGERIS, T.; BAO, Y.; KORTHUIS, R. J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. **Redox Biology**, v. 2, n. 2014, p. 702-714, June 2014.

KERENDI, F.; KIN, H.; HALKOS, M. E.; JIANG, R.; ZATTA, A. J.; ZHAO, Z. Q.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. **Basic Research in Cardiology**, v. 100, n. 5, p. 404-412, Sept. 2005.

KHANNA, A.; ROSSMAN, J. E.; FUNG, H. L.; CATY, M. G. Attenuated nitric oxide synthase activity and protein expression accompany intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 1, p. 160-164, Mar. 2000.

KLASS, A. A. Embolectomy in acute mesenteric occlusion. **Annals of Surgery**, v. 134, n. 5, p. 913-917, Nov. 1951.

KLOTZ, S.; VESTRING, T.; ROTKER, J.; SCHMIDT, C.; SCHELD, H. H.; SCHMID, C. Diagnosis and treatment of nonocclusive mesenteric ischaemia after open heart surgery. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 72, n. 5, p. 1583-1586, Nov. 2001.

KONSTANTINOV, I. E.; ARAB, S.; LI, J.; COLES, J. G.; BOSCARINO, C.; MORI, A.; CUKERMAN, E.; DAWOOD, F.; CHEUNG, M. M.; SHIMIZU, M.; LIU, P. P.; REDINGTON, A. N. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 130, n. 5, p. 1326–1332, Nov. 2005.

KUMAMOTO, T.; MATSUDA, A.; KATAOBA, M.; KOKUBA, Y. Inhibition by aminosaliclates of lipid peroxidation in large intestinal mucosa after mesenteric ischemia/reperfusion in the rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 187-189, Oct. 1997.

LAI, C. H.; LEE, C. H.; HUNG, C. Y.; LO, H. C. Oral citrulline mitigates inflammation and jejunal damage via the Inactivation of neuronal nitric oxide synthase and nuclear factor-κB in intestinal ischemia and reperfusion. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, June 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Oral+citrulline+mitigates+inflammation+and+jejunal+damage+via+the+Inactivation+of+neuronal+nitric+oxide+synthase+and+nuclear+factor-κB+in+intestinal+ischemia+and+reperfusion>>. Acesso em 23 abr.2016.

LAPCHAK, P. H.; IOANNOU, A.; RANI, P.; LIEBERMAN, L. A.; YOSHIYA, K.; KANNAN, L.; DALLE LUCCA, J. J.; KOWALSKA, M. A.; TSOKOS, G. C. The role of platelet factor 4 in local and remote tissue damage in a mouse model of mesenteric ischemia/reperfusion injury. **Public Library of Science One**, v. 7, n. 7, July 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3391230/>> Acesso em 05 ago.2016.

LEE, J. C.; TAE, H. J.; CHEN, B. H.; CHO, J. H.; KIM, I. H.; AHN, J. H.; PARK, J. H.; SHIN, B. N.; LEE, H. Y.; CHO, Y. S.; CHO, J. H.; HONG, S.; CHOI, S. Y.; WON, M. H.; PARK, C. W. Failure in neuroprotection of remote limb ischemic postconditioning in the hippocampus of a gerbil model of transient cerebral ischemia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 358, n. 1-2, p. 377-384, Nov. 2015.

LIM, S. Y.; DAVIDSON, S. M.; HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 3, p. 530-535, Aug. 2007.

LIM, S. Y.; HAUSENLOY, D. J. Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 27, Feb. 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3282534/>>. Acesso em 24 abr.2016.

LIU, K. X.; CHEN, S. Q.; HUANG, W. Q.; LI, Y. S.; IRWIN, M. G.; XIA, Z. Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 107, n. 6, p. 1884-1891, Dec. 2008.

LIU, X.; CHEN, H.; ZHAN, B.; XING, B.; ZHOU, J.; ZHU, H.; CHEN, Z. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: The role of NO. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, n. 3, p. 628-634, Aug. 2007.

LOUKOGEORGAKIS, S. P.; PANAGIOTIDOU, A. T.; YELLON, D. M.; DEANFIELD, J. E.; McALLISTER, R. J. Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. **Circulation**, v. 113, n. 7, p. 1015-1019, Feb. 2006.

LUO, W.; LI, B.; LIN, G.; HUANG, R. Postconditioning in cardiac surgery for tetralogy of Fallot. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 133, n. 5, p. 1373-1374, May 2007.

MACARENCO, R. S. S.; TAKAHAGI, R. U.; BARDELLA, L. C.; SEQUEIRA, J. L.; YOSHIDA, W. B.; Estudo da ação do extrato de ginkgo biloba e amido hidroxietílico hipertônico na atenuação de alterações decorrentes de isquemia e reperfusão de órgãos esplâncnicos em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 139-145, set. 2001.

MALLICK, I. H.; YANG, W.; WINSLET, M. C.; SEIFALIAN, A. M. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. **The British Journal of Surgery**, v. 92, n. 9, p. 1169-1176, Sept. 2005.

MANINTVELD, O. C.; HEKKERT, M.; VAN DEN BOS, E. J.; SUURENBROEK, G. M.; DEKKERS, D. H.; VERDOUW, P. D.; LAMERS, J. M.; DUNCKER, D. J. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 3, p. H1551-H1560, Mar. 2007.

MARQUES, G. M. N.; RASSLAN, R.; BELON, A. R.; CARVALHO, J. G.; FELICE NETO, R.; RASSLAN, S.; UTIYAMA, E. N.; MONTERO, E. F. S. Pentoxifylline associated to hypertonic saline solution attenuates inflammatory process and apoptosis after intestinal ischemia/reperfusion in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 735-741, Nov. 2014.

MENON, N. J.; AMIN, A. M.; MOHAMMED, A.; HAMILTON, G. Acute mesenteric ischaemia. **Acta Chirurgica Belgica**, v. 105, n. 4, p. 344-354, Aug. 2005.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, n. 5, p. 1124-1136, Nov. 1986.

NAKAMURA, R. K.; SANTOS, C. H. M.; MIIJI, L. N. O.; ARAKAKI, M. S.; MAEDO, C. M.; ÉRNICA FILHO, M.; CASSINO, P. C.; PONTES, E. R. J. C. Very short cycles of postconditioning have no protective effect against reperfusion injury. Experimental study in rats. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 29, n. 4, p. 521-526, Oct./Dec. 2014.

NIU, X.; ZHANG, J.; CHEN, D.; WAN, G.; ZHANG, G.; YAO, Y. Remote ischaemic conditioning in percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of randomised trials. **Advances in Interventional Cardiology**, v. 10, n. 4, p. 274-282, Nov. 2014.

ONAL, O.; YETISIR, F.; SARER, A. E. S.; ZEYBEK, N. D.; ONAL, C. O.; YUREKLI, B.; KILIC, M. Prophylactic ozone administration reduces intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat. **Mediators of Inflammation**, June 2015. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487723/>>. Acesso em: 23 abr.2016.

ONODY, P.; ROSERO, O.; KOVACS, T.; GARBAISZ, D.; HEGEDUS, V.; LOTZ, G.; HARSANYI, L.; SZIJARTO, A. Postconditioning - effective method against distant organ dysfunction?. **Magyar Sebeszet**, v. 65, n. 4, p. 222-229, Aug. 2012.

OZBAN, M.; AYDIN, C.; CEVAHIR, N.; YENISEY, C.; BIRSEN, O.; GUMRUKCU, G.; AYDIN, B.; BERBER, I. The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. **BMC Surgery**, Mar. 2015. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355544/>>. Acesso em: 23 abr.2016.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **The American Journal of Physiology**, v. 250, n. 6, p. 749-753, June. 1986a.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 548, n. 1, p. 87-99, 1986b.

PATEL, H. H.; MOORE, J.; HSU, A. K.; GROSS, G. J. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 10, p. 1317-1323, Oct. 2002.

PELL, T. J.; BAXTER, G. F.; YELLON, D. M.; DREW, G. M. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 5, p. H1542-H1547, Nov. 1998.

REZENDE, J. M. Dos quatro humores às quatro bases. In: REZENDE, J. M. **À sombra do plátano: crônicas de história da medicina**. São Paulo: Editora Unifesp, 2009. cap. 4, p. 49-53.

REHNI, A. K.; SINGH, N. Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. **Pharmacological Reports**, v. 59, n. 2, p. 192-198, Mar. 2007.

RICCA, L.; LEMOINE, A.; CAUCHY, F.; HAMELIN, J.; SEBAGH, M.; ESPOSTI, D. D.; SALLOUM, C.; VIBERT, E.; BALDUCCI, G.; AZOULAY, D. Ischemic postconditioning of the liver graft in adult liver transplantation. **Transplantation**, v. 99, n. 8, p. 1633-1643, Aug. 2015.

ROSERO, O.; ONODY, P.; STANGL, R.; TUROCZI, Z.; FULOP, A.; GARBAISZ, D.; LOTZ, G.; HARSANYI, L.; SZIJARTO, A. Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model? **The Journal of Surgical Research**, v. 187, n. 2, p. 427-437, Apr. 2014.

RUIZ-MEANA, M.; GARCÍA-DORADO, D. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. **Revista Española de Cardiología**, v. 62, n. 2, p. 199-209, Feb. 2009.

SANADA, S.; KOMURO, I.; KITAKAZE, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 5, p. 1723-1741, Nov. 2011.

SANTOS, C. H. M.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C. D. V.; MIIJI, L. N. O.; BISPO, M. A. F. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 22-28, Feb. 2008.

SANTOS, C. H. M.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C. D. V.; MIIJI, L. N. O.; BISPO, M. A. F. Avaliação do pós-condicionamento isquêmico no tratamento da isquemia mesentérica: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 2, p. 150-156, June 2009.

SANTOS, C. H. M.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C. D. V.; MIIJI, L. N. O.; HIGA, E. I. Uso do propofol (2,6 diisopropilfenol) como inibidor da lesão tecidual na isquemia e reperfusão mesentérica. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 347-354, July/Sept. 2003.

SANTOS, C. H. M.; PONTES, J. C. D. V.; MIIJI, L. N. O.; NAKAMURA, D. I.; GALHARDO, C. A. V.; AGUENA, S. M. Postconditioning effect in the hepatic ischemia and reperfusion in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 163-168, Apr. 2010.

SASAKI, H.; SHIMIZU, M.; OGAWA, K.; OKAZAKI, F.; TANIGUCHI, M.; TANIGUCHI, I.; MOCHIZUKI, S. Brief ischemia-reperfusion performed after prolonged ischemia (ischemic postconditioning) can terminate reperfusion arrhythmias with no reduction of cardiac function in rats. **International Heart Journal**, v. 48, n. 2, p. 205-213, Mar. 2007.

SATO, H.; JORDAN, J. E.; ZHAO, Z. Q.; SARVOTHAM, S. S.; VINTEN-JOHANSEN, J. Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 64, n. 4, p. 1099-1107, Oct. 1997.

SAXENA, P.; NEWMAN, M. A.; SHEHATHA, J. S.; REDINGTON, A. N.; KONSTANTINOV, I. E. Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 25, n. 1, p. 127-134, Jan./Feb. 2010.

SCHANAIDER, A.; PERROTTA, U.; MADI, K. Importância dos radicais livres derivados do oxigênio na fisiopatologia das afecções isquêmicas intestinais. **A Folha Médica**, v. 103, n. 2, p. 53-58, ago. 1991.

SCHIPKE, J. D.; HALKOS, M. E.; KERENDI, F.; GAMS, E.; VINTEN-JOHANSEN, J. Postconditioning: a brief review. **Archives of Medical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 137-145, Sept. 2006.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n.4, p. 308-313, jul./ago. 2004.

SEIFI, B.; KADKHODAEI, M.; NAJAFI, A.; MAHMOUDI, A. Protection of liver as a remote organ after renal ischemia-reperfusion injury by renal ischemic postconditioning. **International Journal of Nephrology**, Mar. 2014. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ijn/2014/120391/> Acesso em: 23 Abr.2016.

SENGUL, I.; SENGUL, D.; GULER, O.; HASANOGLU, A.; URHAN, M. K.; TANER, A. S.; VINTEN-JOHANSEN, J. Postconditioning attenuates acute intestinal ischemia-reperfusion injury. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 29, n. 3, p. 119-127, Mar. 2013.

SHAW, R. S.; MAYNARD III, E. P. Acute and chronic thrombosis of the mesenteric arteries associated with malabsorption: A report of two cases successfully treated by thromboendarterectomy. **The New England Journal of Medicine**, v. 258, n. 18, p. 874-878, May. 1958.

SHIMIZU, M.; SAXENA, P.; KONSTANTINOV, I. E.; CHEREPANOV, V.; CHEUNG, M. M.; WEARDEN, P.; ZHANGDONG, H.; SCHIMIDT, M.; DOWNEY, G. P.; REDINGTON, A. N. Remote ischemic preconditioning decreases adhesion and selectively modifies functional responses of human neutrophils. **The Journal of Surgical Research**, v. 158, n. 1, p. 155–161, Jan. 2010.

SIMON, R. Post-conditioning and reperfusion injury in the treatment of stroke. **Dose Response**, v. 12, n. 4, p. 590-599, Dec. 2014.

SINGH, D.; CHOPRA, K. Evidence of the role of angiotensin AT(1) receptors in remote renal preconditioning of myocardium. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 117–122, Mar. 2004.

SIZLAN, A.; GUVEN, A.; UYSAL, B.; YANARATES, O.; ATIM, A.; OZTAS, E.; COSAR, A.; KORKMAZ, A. Proanthocyanidin protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. **World Journal of Surgery**, v. 33, n. 7, p. 1384-1391, July 2009.

SKYSCHALLY, A.; VAN CASTER, P.; ILIODROMITIS, E. K.; SCHULZ, R.; KREMASTINOS, D. T.; HEUSCH, G. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. **Basic Research in Cardiology**, v. 104, n. 5, p. 469-483, Sept. 2009.

SOTOUDEH, A.; TAKHTFOOLADI, M. A.; JAHANSHAHI, A.; ASL, A. H.; TAKHTFOOLADI, H. A.; KHANSARI, M. Effect of N-acetylcysteine on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion. Histopathological study in rat model. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n.2, p. 168-171, Feb. 2012.

STAAT, P.; RIOUFOL, G.; PIOT, C.; COTTIN, Y.; CUNG, T. T.; L'HUILLIER, I.; AUPETIT, J. F.; BONNEFOY, E.; FINET, G.; ANDRE-FOUET, X.; OVIZE, M. Postconditioning the human heart. **Circulation**, v. 112, n. 14, p. 2143-2148, Oct. 2005.

STRINGA, P.; LAUSADA, N.; ROMANIN, D.; PORTIANSKY, E.; ZANUZZI, C.; MACHUCA, M.; GONDOLESI, G.; RUMBO, M. Pretreatment combination reduces remote organ damage secondary to intestinal reperfusion injury in mice: follow-up study. **Transplantation Proceedings**, v. 48, n. 1, p. 210-216, Jan.-Feb. 2016.

SU, B.; DONG, H.; MA, R.; ZHANG, X.; DING, Q.; XIONG, L. Cannabinoid 1 receptor mediation of spinal cord ischemic tolerance induced by limb remote ischemia preconditioning in rats. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 138, n. 6, p. 1409-1416, Dec. 2009.

SUN, H. Y.; WANG, N. P.; KERENDI, F.; HALKOS, M.; KIN, H.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J.; ZHAO, Z. Q. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 4, p. 1900-1908, Apr. 2005.

TAKEDA, K.; JIN, M. B.; FUJITA, M.; FUKAI, M.; SAKURAI, T.; NAKAYAMA, M.; TANIGUCHI, M.; SUZUKI, T.; SHIMAMURA, T.; FURUKAWA, H.; TODO, S. A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. **Surgery**, v. 133, n. 2, p. 197-206, Feb. 2003.

TAKAOKA, A.; NAKAE, I.; MITSUNAMI, K.; YABE, T.; MORIKAWA, S.; INUBUSHI, T.; KINOSHITA, M. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". **Journal of the American College of Cardiology**, v. 33, n. 2, p. 556-564, Feb. 1999.

THEODORAKI, K.; KARMANIOLOU, I.; TYMPA, A.; TASOULIS, NASTOS, VASSILIOU, I.; ARKADOPOULOS, N.; SMYRNIOU, V. Beyond preconditioning: postconditioning as an alternative technique in the prevention of liver ischemia-reperfusion injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, June 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909928/>> Acesso em: 08 ago.2016

THIBAUT, H.; PIOT, C.; OVIZE, M. Postconditioning in man. **Heart Failure Reviews**, v. 12, n. 3-4, p. 245-248, Dec. 2007.

THOMAZ NETO, F. J.; KOIKE, M. K.; ABRAHÃO, M. S.; CARILLO NETO, F.; PEREIRA, R. K. H.; MACHADO, J. L. M.; MONTERO, E. F. S. Ischemic preconditioning attenuates remote pulmonary inflammatory infiltration of diabetic rats

with an intestinal and hepatic ischemia-reperfusion injury. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 174-178, Mar. 2013.

TSUBOTA, H.; MARUI, A.; ESAKI, J.; BIR, S. C.; IKEDA, T.; SAKATA, R. Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 40, n. 6, p. 804–809, Dec. 2010.

VINTEN-JOHANSEN, J. Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion. **Heart Failure Reviews**, v. 12, n. 3-4, p. 235-244, Dec. 2007.

VINTEN-JOHANSEN, J.; YELLON, D. M.; OPIE, L. H. Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 112, n. 14, p. 2085-2088, Oct. 2005;

WANG, J.; QIAO, L.; LI, S.; YANG, G. Protective effect of ginsenoside Rb1 against lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1214-1226, Jan. 2013.

WARD, D. T.; LAWSON, A. S.; GALLAGHER, C. M.; CONNER, W. C.; SHEA-DONOHUE, T. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. **The Journal of Surgical Research**, v. 89, n. 1, p. 13-19, Mar. 2000.

YAMAGUCHI, T.; DAYTON, C.; SHIGEMATSU, T.; CARTER, P.; YOSHIKAWA, T.; GUTE, D. C.; KORTHUIS, R. Preconditioning with ethanol prevents postischemic leukocyte-endothelial cell adhesive interactions. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 3, p. 1019-1030, Sept. 2002.

YIN, Z.; GAO, H.; WANG, H.; LI, L.; DI, C.; LUAN, R.; TAO, L. Ischaemic post-conditioning protects both adult and aged Sprague-Dawley rat heart from ischaemia-reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT and glycogen synthase kinase-3beta pathways. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 8, p. 756-763, Aug. 2009.

YOON, S. Y.; KIM, C. Y.; HAN, H. J.; LEE, K. O.; SONG, T. J. Protective effect of ischemic postconditioning against hepatic ischemic reperfusion injury in rat liver. **Annals of Surgical Treatments and Research**, v. 88, n.5, p. 241-245, May 2015.

ZHAO, W.; ZHOU, S.; YAO, W.; GAN, X.; SU, G.; YUAN, D.; HEI, Z. Propofol prevents lung injury after intestinal ischemia-reperfusion by inhibiting the interaction between mast cell activation and oxidative stress. **Life Sciences**, v. 108, n. 2, p. 80-87, July 2014.

ZHAO, Z. Q.; CORVERA, J. S.; HALKOS, M. E.; KERENDI, F.; WANG, N. P.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2, p. 579-588, Aug. 2003.

ZHOU, T.; CHUANG, C. C.; ZUO, L. Molecular characterization of reactive oxygen species in myocardial ischemia-reperfusion injury. **BioMed Research International**, Oct. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4609796/>>. Acesso em: 21 abr.2016.

ZHOU, Y.; FATHALI, N.; LEKIC, T.; OSTROWSKI, R. P.; CHEN, C.; MARTIN, R. D.; TANG, J.; ZHANG, J. H. Remote limb ischemic postconditioning protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rat pups by the opioid receptor/Akt pathway. **Stroke**, v. 42, n. 2, p. 439– 444, Feb. 2011.

ANEXOS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 594/2014 do Pesquisador Carlos Henrique Marques dos Santos, referente ao projeto de pesquisa "Avaliação de diferentes métodos de emprego do pós-condicionamento isquêmico na prevenção das lesões de reperfusão mesentérica", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 25 de junho de 2014.

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 05 de agosto de 2016.

2ª. via emitida em 05/08/2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua_2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

9 – ORIGINAL ARTICLE
ISCHEMIA-REPERFUSION

Importance of duration and number of ischemic postconditioning cycles in preventing reperfusion mesenteric injuries. Experimental study in rats¹

Carlos Henrique Marques dos Santos^I, Ricardo Dutra Aydos^I, Ed Nogueira Neto^{II}, Luciana Nakao Odashiro Miji^{III}, Pedro Carvalho Cassino^{IV}, Isadora Ishaq Ahmed^V, Nadia Meneguesso Calheiros^V, Milena Garcia^V, Anderson Fernandes da Silva^{IV}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502015010000009>

^IPhD, Associate Professor, Department of Surgery, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS, Brazil. Conception and design of the study, interpretation of data, manuscript writing, critical revision.

^{II}MD, Resident, Department of Surgery, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Acquisition, interpretation and analysis of data.

^{III}PhD, Associate Professor, Department of Pathology, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Histopathological examinations.

^{IV}Master, Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Health and Development in Region Midwest, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Technical procedures, acquisition of data.

^VGraduate student, School of Medicine, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil. Acquisition, interpretation and analysis of data.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the effect of ischemic postconditioning (IPC) on intestinal mucosa of rats subjected to ischemia and reperfusion process comparing two cycles of reperfusion and ischemia lasting two minutes each and four cycles of reperfusion and ischemia lasting 30 seconds each

METHODS: Thirty Wistar rats were distributed into three groups: group A (10 rats), ischemia (30 minutes) and reperfusion (60 minutes); group B (10 rats), ischemia and reperfusion plus IPC by two lasting two minutes each; and Group C (10 rats), ischemia and reperfusion plus IPC by four cycles lasting 30 seconds each. Finally, a segment of small intestine was resected for histological analysis. We analysed the results according to Chiu *et al.* classification and proceeded to the statistical treatment by Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

RESULTS: The mean degree of tissue injury according to Chiu *et al.* classification were: Group A, 2.77; in group B, 1.4; and group C, 1.4. B X C ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: Ischemic postconditioning was able to minimize reperfusion injury of rats undergone mesenteric ischemia and reperfusion process. There was no difference in the effectiveness of the method comparing two cycles of two minutes with four cycles of 30 seconds by H&E histological evaluation of the ileum after 60-minute reperfusion.

Key words: Ischemic Postconditioning. Ischemia. Reperfusion. Intestines. Rats.

Ischemic Postconditioning Assessment in the Liver of Rats Undergoing Mesenteric Ischemia and Reperfusion

Carlos Henrique Marques dos Santos¹, MD, PhD; Ricardo Dutra Aydos¹, MD, PhD; Ed Nogueira Neto¹, MD, MSc; Luciana Nakao Odashiro Mijji¹, MD, PhD; Pedro Carvalho Cassino¹, MD; Isadora Ishaq Alves¹; Nádia Menegusso Calheiros¹; Milena Garcia¹



DOI: 10.5935/1678-9741.20160068

Abstract

Introduction: Ischemic postconditioning is a method that shows evidence of efficacy in minimizing reperfusion injury; however, its effectiveness in preventing injuries in distant organs is still unknown, especially in those who have undergone mesenteric ischemia and reperfusion.

Objective: To evaluate the effect of ischemic postconditioning in preventing reperfusion injury in the liver of rats submitted to mesenteric ischemia and reperfusion, comparing two different methods of ischemic postconditioning.

Methods: 30 Wistar male rats were used, distributed into three groups: Group A: Ten rats submitted to intestinal ischemia for 30 minutes followed by reperfusion for 60 minutes; Group B: Ten rats subjected to ischemia and reperfusion; after ischemia, two cycles of reperfusion (two minutes each) interleaved with two cycles of ischemia (two minutes each); and Group C: Ten rats

subjected to ischemia and reperfusion; after ischemia, four cycles of reperfusion (30 seconds each) interspersed with four cycles of ischemia (30 seconds each). After the experiment, the left lobe of the liver was resected for subsequent histological analysis, using the following classification: grade 1 - centrilobular congestion; grade 2 - centrilobular congestion with some degeneration of hepatocytes in one or two central veins; and grade 3 - multifocal centrilobular congestion and degeneration of portal hepatocytes.

Results: The mean degree of liver damage found was 1.8 in group A, 1.7 in group B and 1.3 in group C. There was no statistically significant difference between the groups.

Conclusion: Ischemic postconditioning was unable to minimize reperfusion injury in rats undergoing mesenteric ischemia and reperfusion.

Keywords: Mesenteric Vascular Occlusion. Ischemia. Ischemic Postconditioning. Rats, Wistar. Reperfusion Injury.

Evaluation of Pulmonary Reperfusion Injury in Rats Undergoing Mesenteric Ischemia and Reperfusion and Protective Effect of Postconditioning on this Process

Carlos Henrique Marques dos Santos¹, MD, PhD; Ricardo Dutra Aydos¹, MD, PhD; Ed Nogueira Neto¹, MD; Luciana Nakao Odashiro Mijji², MD, PhD; Pedro Carvalho Cassino³, MD, MSc, PhD; Isadora Ishaq Alves⁴; Nádia Meneguesso Calheiros⁴; Milena Garcia⁴



DOI: 10.5935/1678-9741.20150067

Abstract

Introduction: Some publications have demonstrated the presence of lung reperfusion injury in mesenteric ischemia and reperfusion (I/R), but under too diverse methods. Postconditioning has been recognized as effective in preventing reperfusion injury in various organs and tissues. However, its effectiveness has not been evaluated in the prevention of lung reperfusion injury after mesenteric ischemia and reperfusion.

Objective: To evaluate the presence of pulmonary reperfusion injury and the protective effect of ischemic postconditioning on lung parenchyma in rats submitted to mesenteric ischemia and reperfusion.

Methods: Thirty Wistar rats were distributed into three groups: group A (10 rats), which was held mesenteric ischemia (30 minutes) and reperfusion (60 minutes); group B (10 rats), ischemia

and reperfusion, interspersed by postconditioning with two alternating cycles of reperfusion and reocclusion, for two minutes each; and group C (10 rats), ischemia and reperfusion interleaved by postconditioning with four alternating cycles of reperfusion and reocclusion of 30 seconds each. Finally, it was resected the upper lung lobe for histological analysis.

Results: There were mild lung lesions (grade 1) in all samples. There was no statistical difference between groups 1 and 2 ($P>0.05$).

Conclusion: The mesenteric ischemia and reperfusion in rats for thirty and sixty minutes, respectively, caused mild reperfusion injury in lung. Postconditioning was not able to minimize the remote reperfusion injury and there was no difference comparing two cycles of two minutes with four cycles of 30 seconds.

Keywords: Ischemic Postconditioning. Ischemia. Lung Injury. Reperfusion Injury. Intestinal Mucosa.