

DIFERENTES PROTOCOLOS DE PÓS-CONDICIONAMENTO NÃO ATENUA A LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO MESENTÉRICA APÓS CURTO PERÍODO DE REPERFUSÃO

Different protocols of postconditioning does not attenuate mesenteric ischemia-reperfusion injury after short-term reperfusion

Marcus Vinicius Henriques **BRITO**¹, Edson Yuzur **YASOJIMA**¹, Andressa Abnader **MACHADO**¹,
Matheus Paiva Pacheco Reis **SILVEIRA**¹, Renan Kleber Costa **TEIXEIRA**¹, Vitor Nagai **YAMAKI**¹, Felipe Lobato da Silva **COSTA**¹

Trabalho realizado no ¹Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual do Pará - UEPA, Belém, PA, Brasil.

DESCRITORES - Doença vascular intestinal. Intestino delgado. Pós-condicionamento. Ratos

RESUMO – Racional: O desfecho satisfatório na abordagem cirúrgica da obesidade deve contemplar, além da perda de peso, alteração significativa nas comorbidades preexistentes e na qualidade de vida dos pacientes. **Objetivo:** Avaliar a qualidade de vida no pós-operatório tardio de pacientes submetidos à cirurgia de gastrectomia vertical por videolaparoscopia. **Métodos:** Foi aplicado o questionário “Bariatric Analysis and Reporting Outcome System” (BAROS) em pacientes submetidos à gastrectomia vertical por videolaparoscopia. **Resultados:** Foram avaliados 47 pacientes, entre 21 e 60 anos de idade. O IMC médio antes da operação era 43,06±5,87 kg/m². A média percentual de redução do excesso de peso após foi de 85,46±23,6%. A pontuação obtida pelos pacientes no questionário sobre a melhora na qualidade de vida evidenciou resultado excelente (36,17%), ótimo (40,43%), bom (21,28%) e razoável (2,13%). Houve melhora clínica após a operação em todas as comorbidades investigadas. **Conclusão:** A perda de peso foi fundamental para a melhoria na qualidade de vida e proporcionou resolução ou a melhora clínica em todas as comorbidades investigadas.

Correspondência:
Renan Kleber Costa Teixeira
E-mail: renankleber@hotmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há.

Recebido para publicação: 27/09/2016
Aceito para publicação: 10/01/2017

HEADINGS - Mesenteric vascular disease. Small intestine. Post-conditioning. Rats.

ABSTRACT - Background: Mesenteric ischemia is a challenging diagnosis. Delay in diagnosis can lead to extent bowel necrosis and poor outcomes. Ischemia and reperfusion syndrome plays an important role in this scenario. **Aim:** To access effects of different post-conditioning cycles on mesenteric ischemia-reperfusion syndrome. **Method:** Twenty-five rats were assigned into five groups: Sham, used to establish normal parameters; control group, submitted to mesenteric ischemia for 30 min; in groups GP3, GP1 and GP30, ischemia was followed by post-conditioning protocol, which consisted of 1 cycle of 3 min (GP3), 3 cycles of 1 min (GP1) or 6 cycles of 30 s (GP30), respectively. Ileum samples were harvested after one hour of reperfusion. Intestinal mucosal injury was evaluated through histopathological analysis. **Results:** The average of mesenteric injury degree was 0 in the sham group, 3.6 in the control group, 3.4 in GP3, 3.2 in GP1, and 3.0 in GP30; villous length average was 161.59 in sham group, 136.27 in control group, 135.89 in GP3, 129.46 in GP1, and 135.18 in GP30. Was found significant difference between sham and other groups (p<0.05); however, there was no difference among post-conditioning groups. **Conclusion:** Post-conditioning adopted protocols were not able to protect intestinal mucosa integrity after mesenteric ischemia and short term reperfusion.

INTRODUÇÃO

A isquemia mesentérica é um desafio diagnóstico. A demora dele está associada à extensa necrose intestinal e resultados ruins, acarretando várias consequências pós-operatórias, como diarreia, má absorção, síndrome do intestino curto e morte. A síndrome de isquemia e reperfusão desempenha papel importante neste cenário⁹.

Durante a isquemia há insuficiência da bomba Na⁺/K⁺, influxo de Ca²⁺, formação de substâncias ácidas, promoção da lesão endotelial, aumento da permeabilidade da microcirculação e edema tecidual que ativa a resposta inflamatória¹³. No entanto, o dano tecidual não se limita à isquemia. Quando a oxigenação tecidual é restaurada, o ele é agravado pela lesão de reperfusão que é ainda mais prejudicial que a isquemia^{2,10,11,24}.

Com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios da lesão por isquemia e reperfusão Murry et al.¹⁴ introduziram o conceito de pré-condicionamento isquêmico, que consiste em curtos períodos de isquemia seguida de curta reperfusão, antes de uma fase isquêmica mais longa, visando induzir a tolerância do órgão à lesão de isquemia-reperfusão^{14,19}. Vários estudos clínicos e experimentais demonstraram o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico, assim como sua capacidade de reduzir o dano tecidual^{7,15,17}. No entanto, em certas situações clínicas, é muitas vezes difícil prever quando ocorrerá isquemia, limitando a aplicabilidade do pré-condicionamento¹⁶.

Em 2003, Zhao et al.²⁵ iniciaram o conceito de pós-condicionamento isquêmico,

que consiste em realizar ciclos curtos de isquemia, seguidos por curtos ciclos de reperfusão, imediatamente após a isquemia e antes da reperfusão permanente. Estudos experimentais mostraram que o pós-condicionamento isquêmico é efetivo na prevenção da lesão de isquemia-reperfusão em vários tecidos, com efeito similar ao pré-condicionamento isquêmico^{5,12,20}. No entanto, quando analisados em uma fase hiperaguda, o pós-condicionamento não foi capaz de reduzir os danos causados pela isquemia e síndrome de reperfusão¹.

Assim, este estudo pretende investigar os efeitos de diferentes ciclos de pós-condicionamento na lesão de isquemia-reperfusão mesentérica induzida em um período de reperfusão de curto prazo.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Estado do Pará - UEPA, protocolo 22/10. Foram utilizados 25 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) obtidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental, pesando entre 200-240 g e mantidos em ambiente controlado com água e ração ad libitum. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=5), de acordo com o protocolo (Figura 1): 1) grupo sham (SHAM), mesmo procedimento cirúrgico que nos demais grupos, mas sem indução isquêmica intestinal; 2) grupo controle (GC), com isquemia intestinal durante 30 min seguida de reperfusão, sem qualquer forma de condicionamento; 3) grupo pós-condicionamento 3 min (GP3), com isquemia intestinal tratada por 1 ciclo de reperfusão intercalado por 1 ciclo de isquemia, com duração de 3 min cada; 4) grupo pós-condicionamento 1 min (GP1), com isquemia intestinal tratada por 3 ciclos de reperfusão intercalados por 3 ciclos de isquemia, com duração de 1 min cada; 5) grupo pós-condicionamento 30 s (GP30), isquemia intestinal tratada por 6 ciclos de reperfusão intercalados por 6 ciclos de isquemia, com duração de 30 s cada.

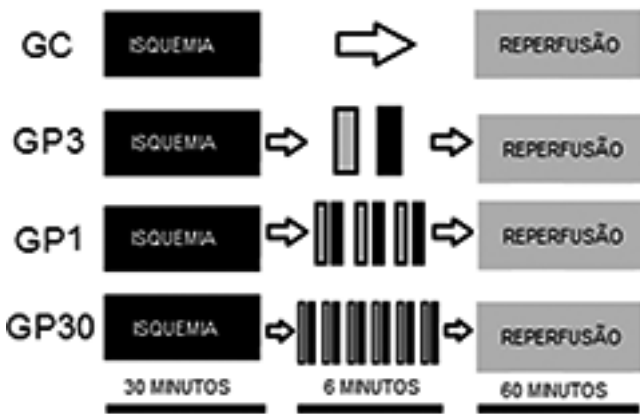


FIGURA 1 - Diagrama ilustrando os protocolos de pós-condicionamento

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia (cetamina - 70 mg/kg e xilazina - 10 mg/kg, intraperitonealmente). Foi realizada uma laparotomia mediana. Durante todo o procedimento, o intestino foi protegido por gaze com soro fisiológico 0,9% aquecido. A artéria mesentérica foi identificada e dissecada, sendo ocluída por um clamp vascular durante 30 min. Após sua oclusão, o intestino delgado foi reposicionado dentro da cavidade abdominal e a pele foi fechada com pontos de náilon 5-0.

Após a isquemia, a cavidade abdominal foi reaberta pela remoção dos pontos. O clamp vascular foi retirado, iniciando o período de reperfusão, durando 60 min. Nos grupos GP3, GP1 e GP30, o pós-condicionamento isquêmico foi realizado de acordo com o protocolo anterior descrito. Após o protocolo,

o abdome foi novamente fechado com pontos contínuos de náilon 5-0 até o final do período de reperfusão.

Após reperfusão, os animais foram submetidos à eutanásia por injeção intravenosa de KCl. Imediatamente após, foi colhida uma amostra de íleo de 3 cm distante 5 cm da válvula cecal. Este fragmento foi fixado em formaldeído tamponado a 10% e submetido ao processamento histológico. As lâminas foram coradas com H&E e examinadas em microscopia ótica para determinar o grau de lesão com base na escala de Chiu et al.⁴ e as medições do comprimento das vilosidades foram feitas medindo dez vilosidades bem orientadas (cortadas ao longo de seu comprimento) em cada um dos animais.

Análise estatística

O teste ANOVA foi utilizado para comparar o comprimento das vilosidades; Kruskal-Wallis, para comparar os resultados histopatológicos e o teste de Correlação Linear de Pearson para determinar se havia relação entre a pontuação de lesão intestinal e o comprimento das vilosidades. Foi adotado nível de significância de 5% para rejeitar a hipótese nula.

RESULTADOS

Durante o procedimento nenhum animal morreu ou manobras de ressuscitação foram realizadas. O escore médio de lesão intestinal é demonstrado na Tabela 1. O grupo Sham mostrou mucosa normal, e houve diferença significativa entre este grupo para todos os outros que sofreram isquemia. Entre os demais grupos não houve diferença significativa (p>0,05).

TABELA 1 - Média e desvio-padrão da pontuação da lesão intestinal de acordo com os grupos

Grupo	Sham*	GC	GP3	GP1	GP30
Escore	0,00 ±0,00	3,60 ±0,57	3,40 ±0,54	3,20 ±0,44	3,00 ±0,70

p<0,05 Sham vs. outros grupos (Kruskal-Wallis)

Em relação ao comprimento dos vilos (Tabela 2), houve diferença entre o Sham e os demais grupos (p<0,05). Entretanto, não houve diferença entre os grupos GC e pós-condicionamento (p>0,05). Houve relação entre a pontuação da lesão intestinal e o comprimento da vilosidade (p=0,0004 r de Pearson= -0,6771).

TABELA 2 - Média e desvio-padrão do comprimento das vilosidades de acordo com os grupos

Grupo	Sham*	GC	GP3	GP1	GP30
Escore	161,59±7,04	136,27±8,80	135,89±5,40	129,46±16,04	135,18±12,88

p<0,05 Sham vs. outros grupos (ANOVA)

DISCUSSÃO

Após evento isquêmico, o restabelecimento do fluxo sanguíneo é a única abordagem para interromper a cascata isquêmica^{2,22}. No entanto, a reperfusão pode resultar em formação de espécies reativas de oxigênio e aumento da reação inflamatória^{2,22}.

Para minimizar os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão foi proposto o uso de soluções hipertônicas²³, plantas medicinais³ e oxigenoterapia¹⁶. Porém, as terapias atualmente mais eficazes são as técnicas de condicionamento isquêmico^{5,7,18,21,22}. O pós-condicionamento se destaca pela sua maior aplicabilidade clínica em comparação com o pré-condicionamento, uma vez que em alguns cenários clínicos não há maneira de prever quando um tecido estará sob isquemia^{5,20,25}.

O pós-condicionamento funciona principalmente pela redução da lesão de reperfusão^{5,20,22,25}, embora, quando analisado após um período de reperfusão de curto prazo, mostre proteção fraca

da lesão estrutural do tecido¹. Portanto, este estudo pretendeu identificar se diferentes protocolos de pós-condicionamento poderiam minimizar o dano da mucosa intestinal precoce após a síndrome de isquemia-reperfusão.

Os resultados evidenciaram que todos os protocolos de pós-condicionamento adotados não conseguiram minimizar os danos na mucosa intestinal secundários à síndrome de isquemia e reperfusão. Tal resultado não invalida nem reduz a importância do pós-condicionamento isquêmico¹; contudo, tal fato revela que não há danos estruturais de reperfusão significativos após um período de reperfusão de curto prazo, possivelmente porque há tempo crítico de reperfusão quando é possível detectar os danos morfológicos.

Esta descoberta é de grande importância, uma vez que durante a reperfusão precoce há maior formação de radicais de oxigênio, mas não são capazes de induzir danos estruturais ao tecido⁶. Por outro lado, é possível que os danos da isquemia-reperfusão sejam minimizados pelo pós-condicionamento, mas não houve tempo suficiente de reperfusão para detectar danos morfológicos da mucosa intestinal por microscopia ótica. Assim, estudos adicionais devem ser conduzidos medindo os marcadores de função celular e as medidas de estrutura para entender melhor os efeitos pós-condicionantes de curto prazo, bem como se há alguma diferença entre os protocolos de pós-condicionamento adotados.

O número de ciclos de pós-condicionamento adotados não modificou o resultado. Não há consenso na literatura sobre o padrão de ciclos pós-condicionamento a serem realizados em cada órgão, uma vez que o metabolismo celular pode influenciar o número de ciclos e sua duração, mas sabe-se que os ciclos curtos são mais eficazes que os ciclos longos^{1,5,12,20,25}.

O resultado negativo desta pesquisa não indica falha¹. A aquisição de conhecimento com possíveis erros, impedindo que outros pesquisadores repitam o mesmo método de estudo, justifica a publicação de resultados desfavoráveis, prática que deve ser estimulada⁸.

CONCLUSÃO

Os protocolos de pós-condicionamento adotados não apresentaram efeito protetor na morfologia da mucosa intestinal após a lesão de isquemia e reperfusão mesentérica.

REFERÊNCIAS

- Bretz B, Blaze C, Parry N, Kudej RK. Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. *Vet Surg*. 2010; 39(2): 216-23.
- Brito MVH, Araújo M, Acácio GJS, Acácio GJS, Reis JMC. Lesão intestinal após isquemia-reperfusão: estudo comparativo usando sal tetrazólico (MTT) e histologia. *Acta Cir Bras*. 2001; 16(1): 26-31.
- Brito MVH, Moreira RJ, Tavares MLC, Carballo MCS, Carneiro TX, Santos AAS. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cir Bras*. 2005; 20(3): 243-6.
- Chiu CT, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states: II. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate. *Arch Surg* 1970; 101:484-8
- Chu W, Li S, Wang S, Yan A, Nie L. Ischemic postconditioning provides protection against ischemia-reperfusion injury in intestines of rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jun 1;8(6):6474-81.
- Francisco Neto A, Silva JCCB, Fagundes DJ, Percário S, Novo NF, Juliano Y, Moreira Neto AA. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. *Acta Cir Bras*. 2005; 20(2): 134-9.
- Gao J, Zhao L, Wang Y, Teng Q, Liang L, Zhang J. Effect of limb ischemic preconditioning on myocardial apoptosis-related proteins in ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med*. 2013; 5(5): 1305-9.
- Gomes HM, Serigiolle LC, Rodrigues DA, Lopes CM, Studart SV, Leme PL. Unfeasible experimental model of normothermic hepatic ischemia and reperfusion in rats using the Pringle maneuver. *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig.* 2014; 27(3): 196-200.
- Higa OH, Parra ER, Ab'Saber AM, Farhat C, Higa R, Capelozzi VL. Protective effects of ascorbic acid pretreatment in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury: a histomorphometric study. *Acta Cir Bras*. 2007; 62(3): 315-20.
- Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*. 1993; 74(4):1515-20.
- Kahlow BS, Nery RA, Skare TL, Ribas CA, Ramos GP, Petisco RD. ON VASCULAR STENOSIS, RESTENOSIS AND MANNANOSE BINDING LECTIN. *Arq Bras Cir Dig*. 2016 Mar; 29(1):57-9. doi:10.1590/0102-6720201600010015
- Lintz JA, Dalio MB, Joviliano EE, Piccinato CE. Ischemic pre and post conditioning in skeletal muscle injury produced by ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2013; 28(6): 441-6.
- Magalhães MA, Barbosa AJ, Figueiredo JA, Alberti LR, Petroianu A. Effects of different periods of gastric ischaemia in the viability of the tissue of body, fundus and antrum region of rabbit stomach. *Arq Bras Cir Dig*. 2015 Jul-Sep; 28(3):167-70. doi:10.1590/S0102-67202015nahead00001.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74(5): 1124-36
- Neves JS, Abrahão MS, Salzedas Netto AA, Montero EFS, Gonzalez AM. Effects of ischemic preconditioning associated to different preservation solutions in protecting the intestinal graft. *Acta Cir Bras*. 2011; 26(5): 396-403.
- Paulo MSL, Paulo ICAL, Nunes TA, da Silva al, Cintra LC, Paulo DNS. Effect of hyperbaric oxygen therapy in rats with subtotal splenectomy preserving the inferior pole. *Acta Cir Bras*. 2011; 26(3): 156-64.
- Saes GF, Zerati AE, Wolosker N, Ragazzo L, Rosoky RMA, Ritti-Dias RM, Cucato GG, Chehuen M, Farah BQ, Puech-Leão P. Remote ischemic preconditioning in patients with intermittent claudication. *Clinics*. 2013; 68(4): 495-9.
- Santos CH, Aydos RD, Nogueira Neto E, Mijji LN, Cassino PC, Ahmed II, Calheiros NM, Garcia M, Silva AF. Importance of duration and number of ischemic postconditioning cycles in preventing reperfusion mesenteric injuries. *Experimental study in rats. Acta Cir Bras*. 2015; 30(10): 709-14.
- Santos CHM, Gomes OM, Mijji LNO, Bispo MAF. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. *Acta Cir Bras*. 2008; 23(1): 22-8.
- Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCD Vieira, Mijji LNO, Bispo MAF. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. *Acta Cir. Bras*. 2008; 23(1): 22-8.
- Yamaki IN, Pontes RVS, Costa FLS, Yamaki VN, Teixeira RKC, Yasojima EY, Brito MVH. Kidney ischemia and reperfusion syndrome: effect of lidocaine and local postconditioning. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2016; 43(5): 348-53.
- Yamaki VN, Goncalves TB, Coelho JVB, Pontes RVS, Costa FLS, Brito MVH. Efeito protetor do per-condicionamento isquêmico remoto nas lesões da síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2012; 39(6): 529-33.
- Yamaki VN, Teixeira RKC, Brito MVH. Use of hypertonic solutions for liver preservation in rats. *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig*. 2013; 26(1): 44-8.
- Zanchet MV, Silva LL, Matias JE, Coelho JC. POST-REPERFUSION LIVER BIOPSY AND ITS VALUE IN PREDICTING MORTALITY AND GRAFT DYSFUNCTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION. *Arq Bras Cir Dig*. 2016 Jul-Sep; 29(3):189-193. doi: 10.1590/0102-6720201600030014.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2003; 285(2): 579-88.