

Tratamento da Isquemia Mesentérica pelo Pós-Condicionamento Isquêmico

Mesenteric Ischemia's Treatment by Postconditioning

CARLOS HENRIQUE MARQUES DOS SANTOS¹; OTONI MOREIRA GOMES²; JOSÉ CARLOS DORSA VIEIRA PONTES³; LUCIANANAKAO ODASHIRO MIJI⁴; MARCO AURÉLIO FELTRIN BISPO⁵

¹ *Doutor em Medicina, Titular da Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Professor Assistente de Gastroenterologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;* ² *Livre Docente – UFMG;* ³ *Doutor em Medicina;* ⁴ *Mestre em Patologia;* ⁵ *Médico Cirurgião Geral.*

SANTOS CHM; GOMES OM; PONTES JCDV; MIJI LNO; BISPO MAF. Tratamento da Isquemia Mesentérica pelo Pós-Condicionamento Isquêmico. *Rev bras Coloproct*, 2008;28(2): 187-192.

RESUMO: Sabe-se que o pré-condicionamento isquêmico tem a capacidade de minimizar as lesões decorrentes do processo de isquemia e reperfusão. Recentemente foi descrito que o pós-condicionamento isquêmico apresenta resultados semelhantes em isquemia e reperfusão miocárdica, cerebral, renal e da medula espinhal, mas não há relatos de utilização deste método na isquemia mesentérica. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do pós-condicionamento isquêmico sobre a lesão tecidual na mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica. **Método:** Foram estudados 20 ratos Wistar, distribuídos em dois grupos: grupo A, em que se realizou isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos) mesentérica; grupo B, isquemia e reperfusão mesentérica e, precedendo o início da reperfusão, foi realizado o pós-condicionamento isquêmico. Ao final, ressecou-se um segmento do intestino delgado para análise histológica. Avaliaram-se os resultados pela classificação de Chiu e procedeu-se o tratamento estatístico. **Resultado:** As médias dos graus de lesão tecidual foram: grupo A, 3,5; grupo B, 1. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$). **Conclusão:** Concluiu-se que o pós-condicionamento isquêmico foi capaz de minimizar a lesão tecidual na mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

Descritores: Isquemia; Reperfusão; Pós-condicionamento; Pré-condicionamento isquêmico; Ratos; Experimentação Animal.

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato de Isquemia Mesentérica descrito por Antonio Benivieni no final do século XV muito se avançou no diagnóstico e tratamento desta afecção¹. O primeiro caso tratado de forma bem sucedida foi descrito por Elliot² em 1895, o qual realizou a ressecção do segmento intestinal gangrenado exteriorizando os cotos intestinais na forma de estomas, tratamento este até hoje muitas vezes empregado. Em 1951, Klass³ 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. Realizou então a primeira embolectomia da artéria mesentérica para o tratamento da isquemia intestinal. A angiografia, descrita em 1966 por Aakhus⁴, a partir de 1973 passou a ser utilizada para o tratamento dos casos de isquemia arterial não-oclusiva pela injeção de substâncias vasodilatadoras.

Apesar destes grandes avanços a taxa de mortalidade permaneceu elevada, fato explicado pela publicação de Parks e Granger⁵ em 1986, que demons-

Trabalho realizado no Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis, Belo Horizonte-MG.

Recebido em 07/03/2008

Aceito para publicação em 08/04/2008

traram ser a reperfusão muito mais lesiva aos tecidos do que a isquemia isoladamente.

Também em 1986, Murry e col.⁶ trouxeram uma grande contribuição para os conhecimentos da fisiopatologia da isquemia e reperfusão, ao apresentarem o conceito do pré-condicionamento isquêmico (PrCI). 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.

Embora os resultados de Murry e col.⁶ tenham sido reproduzidos em vários outros órgãos, inclusive no intestino, na maioria das vezes a isquemia mesentérica é identificada já quando as lesões estão instaladas, não havendo oportunidade para emprego do pré-condicionamento.

Em 2003, Zhao e col.⁷ apresentaram o conceito do pós-condicionamento isquêmico (PoCI), que 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 se dar a reperfusão permanente. Estes autores demonstraram que o PrCI foi tão eficaz quanto o PoCI na prevenção das lesões de reperfusão. Estes bons resultados foram observados também por outros autores na isquemia miocárdica, renal, cerebral e da medula espinhal⁸.

Assim, considerando as atuais evidências do valor do PoCI em minimizar as lesões teciduais decorrentes do processo de isquemia e reperfusão, torna-se de fundamental importância, e é objetivo deste estudo, avaliar a capacidade do PoCI de minimizar a injúria tecidual intestinal no processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

MATERIAIS E MÉTODO

Este estudo obteve aprovação prévia do Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Foram seguidas as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Animais estudados

Foram estudados vinte ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso variando de 270 a 350 gramas, com média de 305 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Grupos constituídos

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

-**Grupo A** – Isquemia e Reperfusão: Dez ratos submetidos à isquemia intestinal por 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular, seguida por reperfusão de 60 minutos.

-**Grupo B** – Pós-condicionamento isquêmico: 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 três ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de isquemia (dois minutos cada).

Anestesia

Os animais foram pesados em balança eletrônica de precisão 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).

Procedimento cirúrgico

Os ratos foram submetidos à laparotomia longitudinal mediana de aproximadamente quatro centímetros, exteriorização do intestino delgado, identificação e dissecação da artéria mesentérica cranial.

No grupo A, a artéria mesentérica cranial foi ocluída por clampe vascular atraumático que permaneceu durante trinta 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 4-0 (mononylon[®]). 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



Figura 1 - Esquema demonstrativo dos períodos de isquemia e reperfusão nos grupos A e B (os números correspondem ao tempo em minutos).

reperfusão, com duração de 60 minutos. Nos dois 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.

No grupo B, realizou-se a fase de isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos). Precedendo a fase de reperfusão foi realizado o pós-condicionamento isquêmico por meio de três ciclos de reperfusão (retirada do clampe vascular atraumático da artéria mesentérica cranial) com duração de dois minutos cada, intercalados com três ciclos de isquemia (oclusão da artéria mesentérica cranial por clampe vascular atraumático), também com duração de dois minutos cada.

Completada a fase de reperfusão, nos dois grupos, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura, e foi ressecado um segmento de aproximadamente um centímetro do íleo, cinco centímetros proximal à transição ileocecal, o qual foi aberto em sua borda antimesentérica, lavado com solução salina e colocado em solução de formaldeído a 10% para posterior análise histológica.

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

Estudo histopatológico

Os segmentos intestinais ressecados, após fixação em solução de formaldeído a 10%, foram submetidos a processamento histológico, e as lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina, e analisadas à microscopia óptica 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 segundo CHIU e col.⁹:

- 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 observada qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado sobre a tela submucosa.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico, aplicando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo estabelecido o nível de significância de $p < 0,05$. Foi utilizado o programa Bioestat 2.0.

RESULTADOS

Após a análise histológica do grau de lesão da mucosa intestinal segundo Chiu e col.⁹, encontrou-se os seguintes resultados (tabela 1 e gráfico 1):

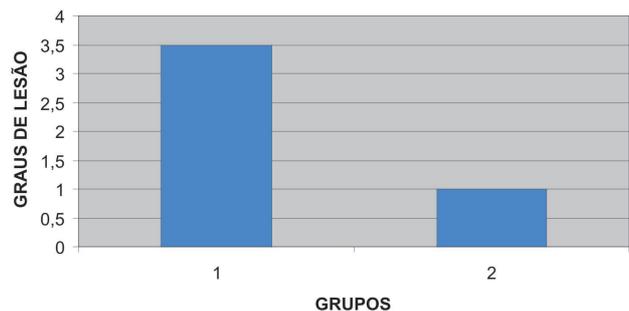


Gráfico 1 - Gráfico comparativo da análise histológica dos graus de lesão intestinal dos grupos A e B segundo Chiu e col.⁹.

Tabela 1 - Resultados da análise histológica dos graus de lesão tecidual da mucosa intestinal dos grupos A e B segundo Chiu e col.⁹

| Ratos | Graus de Lesão Tecidual | |
|--------------|-------------------------|----------|
| | Grupo A | Grupo B |
| 1 | 3 | 0 |
| 2 | 3 | 1 |
| 3 | 3 | 3 |
| 4 | 3 | 1 |
| 5 | 4 | 2 |
| 6 | 4 | 1 |
| 7 | 4 | 0 |
| 8 | 4 | 0 |
| 9 | 4 | 1 |
| 10 | 3 | 1 |
| Média | 3,5 | 1 |

No grupo A, a média do grau de lesão tecidual foi 3,5. Metade dos animais deste grupo teve lesão grau 3 e a outra metade grau 4.

No grupo B, a média do grau de lesão tecidual foi 1. Três animais não tiveram lesão (grau 0), cinco tiveram lesão grau 1, um grau 2 e um grau 3.

Aplicando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A B ($p=0,0002$).

DISCUSSÃO

Desde que Parks e Granger⁵ demonstraram os efeitos lesivos das espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) produzidas durante a reperfusão, muitas pesquisas foram desenvolvidas em busca de um fármaco que pudesse bloquear este processo a fim de minimizar o dano celular e orgânico da isquemia e reperfusão¹⁰.

Com os conhecimentos adquiridos a respeito da fisiopatologia deste processo, parece ser este o caminho para complementar as técnicas de reperfusão já desenvolvidas, mas que infelizmente não alteraram de maneira significativa a mortalidade da isquemia mesentérica.

Provavelmente os melhores resultados no controle da produção das ERTOs se obteve com o PrCI, conforme se demonstrou em inúmeras publicações que se seguiram às de Murry e col.⁶, inclusive na isquemia e reperfusão mesentérica. Entretanto, há pouca aplicabilidade clínica para o PrCI em situações de isquemia mesentérica, uma vez que no momento do diagnóstico já existe isquemia. É por este motivo que o PoCI tem maior interesse neste aspecto, uma vez que se comprovada sua eficácia, muitas serão as situações clínicas com possibilidade de emprego deste método.

O PoCI tem apresentado resultados semelhantes ao PrCI na prevenção das lesões resultantes do processo de isquemia e reperfusão. Entretanto, no momento existe apenas uma publicação¹¹ que demonstra ser este método provavelmente semelhante ao PrCI quanto ao seu efeito neste processo na circulação mesentérica.

ZHAO e col.⁷ foram os primeiros a relatar a semelhança dos resultados do PrCI e do PoCI na prevenção das lesões decorrentes do processo de isquemia e reperfusão. O estudo foi realizado em cães, realizando-se oclusão da artéria descendente anterior esquer-

da por 60 minutos e reperfusão por três horas. O PrCI foi efetuado por um ciclo de isquemia com duração de cinco minutos e reperfusão de dez minutos. O PoCI consistiu de três ciclos de reperfusão e isquemia com duração de 30 segundos cada. A área de infarto foi semelhante nos grupos do PrCI e do PoCI, e significativamente menor que no grupo controle.

A maioria dos estudos que analisaram os efeitos do PoCI foram realizados na isquemia e reperfusão miocárdica. DONATO e col.¹² compararam o PrCI e o PoCI em corações isolados de coelhos, realizando isquemia e reperfusão de 30 minutos. O PrCI foi realizado por um ciclo de isquemia e reperfusão de cinco minutos cada, e, o PoCI por dois ciclos de reperfusão e isquemia de 30 segundos cada. Concluíram que o PoCI reduz o tamanho do infarto na mesma magnitude que o PrCI, sem modificar a disfunção ventricular pós-isquêmica.

Estes resultados também foram obtidos por DARLING e col.¹³ em estudo experimental avaliando infarto em corações de coelhos. O PoCI foi capaz de minimizar a área de infarto em comparação ao grupo controle, realizando-se quatro ciclos de reperfusão e isquemia com duração de 30 segundos antes de se dar a fase de reperfusão.

O PoCI também demonstrou ser eficaz na prevenção das lesões de isquemia e reperfusão experimental na medula espinhal¹⁴, rins¹⁵ e cérebro¹⁶.

O PoCI foi também analisado em seres humanos. STAAT e col.¹⁷ relataram seu efeito benéfico realizando reperfusão intermitente durante angioplastia em pacientes com infarto agudo do miocárdio, tendo observado redução da injúria miocárdica. Também LOUKOGEORGAKIS e col.¹⁸ realizaram estudo experimental em seres humanos em que provocavam isquemia transitória no membro superior seguida de reperfusão, observando efeito protetor do PoCI.

O mecanismo de proteção do PoCI no processo de isquemia e reperfusão 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 PoCI⁷.

Uma produção abundante de ERTOs durante a fase inicial da reperfusão tem sido implicada como o principal fator na patogênese da injúria tecidual. O pico de produção de ERTOs ocorre entre o primeiro

e o sétimo minuto após o início da reperfusão, embora sejam detectáveis tais substâncias em períodos mais tardios¹⁹. O PoCI age nesta fase de forma ainda não totalmente esclarecida, provavelmente atenuando a produção de ERTO pela liberação paulatina de oxigênio aos tecidos²⁰. Por este motivo realizou-se no presente estudo o PoCI logo após a isquemia, realizando-se ciclos curtos de reperfusão e isquemia, uma vez que ainda não há uma definição de qual o melhor tempo a ser utilizado nestes ciclos, nem tampouco o número de ciclos que levaria aos melhores resultados.

Desta forma, acredita-se que os resultados encontrados neste trabalho demonstram que, de forma semelhante ao que se apresenta na literatura, também na isquemia e reperfusão mesentérica de ratos o PoCI exerceu efeito protetor.

CONCLUSÃO

O pós-condicionamento isquêmico foi capaz de minimizar a lesão tecidual na mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

ABSTRACT: It is known that the preconditioning has the capacity to minimize the current lesions of the ischemia and reperfusion process. Recently it was described that the postconditioning presents similar results in miocardic ischemia and reperfusion, brain, kidneys and of the spinal cord, but there are no reports of use of this method in the mesenteric ischemia. **Objective:** The objective of this study is to evaluate the effect of the postconditioning on the tissue lesion in the intestinal mucosa of rats submitted to the ischemia and reperfusion process. **Method:** 20 Wistar rats were studied, distributed in two groups: group A, in that was done mesenteric ischemia (30 minutes) and reperfusion (60 minutes); group B, mesenteric ischemia and reperfusion and, preceding the beginning of the reperfusion, the postconditioning was accomplished. At the end, it was dried up a segment of the small intestine for histological analysis. The results were evaluated by the Chiu's classification and the statistical treatment was proceeded. **Results:** The averages of the degrees of tissue lesion were: group A, 3,5; group B, 1. The difference between the groups was statistically significant ($p < 0,05$). **Conclusion:** The postconditioning was capable to minimize the tissue lesion in the intestinal mucosa of rats submitted to the mesenteric ischemia and reperfusion process.

Key words: Ischemia; Reperfusion; Postconditioning; Preconditioning; Rats; Animal experimentation.

REFERÊNCIAS

1. BOLEY SJ, BRANDT LJ, SAMMARTANO RJ. History of mesenteric ischemia: The evaluation of a diagnosis and management. *Surg Clin North Am* 1997; 77(2): 275-288.
2. ELLIOT JW. The operative relief of gangrene of the intestine due to occlusion of the mesenteric vessels. *Ann Surg* 1895; 21:9-23.
3. KLASS AA. Embolectomy in acute mesenteric occlusion. *Ann Surg* 1951; 134: 913-917.
4. AAKHUS T. The value of angiography in superior mesenteric artery embolism. *Br J Radiol* 1966; 39: 928-932.
5. PARKS DA, GRANGER DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250: 749-753.
6. MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
7. 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; 285:579-588.
8. SCHIPKE JD, HALKOS ME, KERENDI F, GAMS E, VINTEN-JOHANSEN J. Postconditioning: a brief review. *Arch Med Sci* 2006; 2: 137-145.
9. CHIU CJ, McARDLE AH, BROWN R, SCOTT HJ, GURD FN. Intestinal Mucosal Lesion in Low-Flow States. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483.
10. SANTOS CHM, GOMES OM, PONTES JCDV. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. *Rev Bras Coloproctol* 2006; 26(1): 28-33.
11. SANTOS CHM, GOMES OM, PONTES JCDV, MIJI LNO, BISPO MA. Postconditioning: preliminary results of this new option in the treatment of mesenteric ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Sci Forum* 2007; 2(2): 14-25.
12. DONATO M, D'ANNUNZIO V, SABÁN M, FLOR L, GELPI RJ. Poscondicionamiento: un nuevo mecanismo protector. Su comparación con el preconditionamiento en el infarto experimental. *Rev Arg Cardiol* 2004; 72(4): 258-262.
13. DARLING CE, JIANG R, MAYNARD M, WHITTAKER P, VINTEN-JOHANSEN J, PRZYKLENK K. "Postconditioning" via Stuttering Reperfusion Limits Myocardial Infarct Size in Rabbit Hearts: Role of ERK 1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 618-626.

14. 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. *Can J Anaesth* 2007; 54: 42-48.
15. 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. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 628-634.
16. REHNI AK, SINGH N. Role of phosphoinositide 3-kinase in ischemic postconditioning-induced attenuation of cerebral ischemia-evoked behavioral deficits in mice. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 192-198.
17. STAAT P, RIOUFOL G, PIOT C, COTTIN Y, CUNG TT, L'HUILLIER I, AUPETIT JF, BONNEFOY E, FINET G, ANDRE-FOUET X, OVIZE M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112: 2143-2148.
18. LOUKOGEORGAKIS SP, PANAGIOTIDOU AT, YELLON DM, DEANFIELD JE, McALLISTER RJ. Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. *Circulation* 2006; 113: 1015-1019.
19. SUN HY, WANG NP, KERENDI F, HALKOS M, KIN H, GUYTON RA, VINTEN-JOHANSEN J, ZHAO ZQ. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: 1900-1908.
20. LIM SY, DAVIDSON SM, HAUSENLOYDJ, YELLON DM. Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2007; 75(3): 530-535.

Endereço para correspondência:

CARLOS HENRIQUE MARQUES DOS SANTOS
Rua Aluisio de Azevedo, 606 - Jardim São Bento
Campo Grande – Mato Grosso do Sul – Brasil
CEP 79004-050
E-mail: chenriquems@yahoo.com.br