

Wilson Kohama Chimabucuro¹, Bomfim Alves da Silva Junior¹, Ana Iochabel Soares Moretti¹, Irineu Tadeu Velasco¹, Ester Correia Sarmento Rios¹, Francisco Garcia Soriano¹

O impacto das soluções hipertônica e salina fisiológica na reperfusão do trato gastrointestinal pós-isquemia em ratos

The impact of hypertonic and normal saline in gut reperfusion after ischemia in rats

1. Disciplina de Emergências Clínicas, Departamento Clínico, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

RESUMO

Objetivo: Investigar o papel de duas diferentes soluções salinas nos mecanismos de lesão após isquemia intestinal: estresse oxidativo e respostas inflamatórias.

Métodos: Ratos Wistar foram submetidos a oclusão transitória da artéria mesentérica superior e estudados durante as 6 horas seguintes à reperfusão. Após randomização, os animais foram divididos em quatro grupos: Falso; Solução Hipertônica, os quais receberam infusão de solução salina hipertônica a 7,5% (4mL/kg de peso corpóreo); Solução Fisiológica, os quais receberam infusão de solução salina a 0,9% (33mL/kg); e Sem Tratamento. A infusão foi realizada imediatamente antes da reperfusão. Foram realizadas dosagens sequenciais de interleucina 6 e interleucina 10 no plasma. Foram coletadas amostras de tecidos (pulmão, fígado e intestino) para medir malondialdeído, mieloperoxidase e interleucina.

Resultados: Em comparação ao Grupo Sem Tratamento, os animais que receberam volume (Grupos Solução Hipertônica e Solução Fisiológica) mostraram níveis tissulares mais baixos de malondialdeído, mieloperoxidase, interleucina 6 e interleucina 10. As concentrações plasmáticas de interleucina 6 e interleucina 10 foram mais altas nos animais tratados com solução hipertônica do que nos tratados com solução fisiológica e nos sem tratamento.

Conclusão: Neste modelo de isquemia intestinal transitória, a manutenção adequada de volume intravascular diminuiu o estresse oxidativo e a síntese de marcadores de inflamação. Tanto a solução hipertônica quanto a fisiológica atenuaram os efeitos deletérios observados após isquemia intestinal.

Descritores: Solução salina hipertônica/administração & dosagem; Traumatismo por reperfusão/quimioterapia; Artéria mesentérica superior; Inflamação; Isquemia; Interleucinas; Estresse oxidativo; Ratos Wistar

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 12 de março de 2014

Aceito em 10 de maio de 2014

Autor correspondente:

Francisco Garcia Soriano
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3.134 - Cerqueira César
CEP: 01246-000 - São Paulo (SP), Brasil
E-mail: gsoriano@usp.br

Editor responsável: Felipe Dal Pizzol

DOI: 10.5935/0103-507X.20140039

INTRODUÇÃO

A isquemia intestinal é responsável por eventos danosos locais e sistêmicos.^(1,2) Oclusão arterial, inflamação, trauma e todos os tipos de estado de choque têm sido associados com a isquemia intestinal.⁽³⁾ A extensão do sistema intestinal envolvido na lesão de isquemia/reperfusão determina a gravidade da lesão de órgãos à distância. A ruptura da barreira hemato-intestinal ocorre precocemente após a lesão de isquemia/reperfusão, sendo necessário um tempo prolongado até que a mucosa intestinal seja completamente reparada.⁽⁴⁾ Durante esse tempo, endotoxinas e bactérias intestinais conseguem alcançar a circulação sistêmica e incrementar a resposta inflamatória.^(5,6)

A reperfusão intestinal leva a um amplo processo de estresse oxidativo no tecido intestinal, previamente isquêmico.^(2,7) Sob essas condições, são numerosos os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células. Os efeitos adversos das ROS incluem: peroxidação das membranas celulares (tanto da membrana plasmática celular quanto das organelas intracelulares), ruptura de DNA e morte celular.⁽⁸⁾

A reperfusão de um órgão previamente isquêmico ocorre em um cenário intrincado, em que diferentes regiões de restauração completa do fluxo sanguíneo coexistem com outras, com perfusão sanguínea parcial ou ausente.⁽⁹⁾ Em situações de grave hipoperfusão, a produção excessiva de ROS pode ter um efeito cumulativo, comprometendo a perfusão do órgão em razão da formação de rolas celulares (agregação de eritrócitos e leucócitos) em nível microcirculatório.⁽¹⁰⁾ A reperfusão intestinal provoca uma redistribuição do volume intravascular total, levando a um período transitório de hipovolemia sistêmica.⁽⁴⁾

O estudo pioneiro de Velasco et al. demonstrou que pequenas quantidades de solução salina a 7,5% restauraram os parâmetros vitais e diminuíram a mortalidade em cães submetidos a choque hemorrágico grave.⁽¹¹⁾ Desde então, a solução salina hipertônica a 7,5% tem sido extensamente estudada, tanto em condições experimentais quanto clínicas.⁽¹²⁻¹⁶⁾ Após um choque hemorrágico, um pequeno volume de solução salina hipertônica a 7,5% melhora a fração de ejeção cardíaca e a pressão de perfusão, também com melhora do índice cardíaco.⁽¹⁷⁾ Além de suas propriedades nos parâmetros hemodinâmicos, a solução salina hipertônica a 7,5% parece ter uma ação significativa como um fármaco anti-inflamatório.^(18,19)

Em comparação ao tratamento convencional do choque hemorrágico com alto volume de solução salina fisiológica, o uso de um volume pequeno de solução salina hipertônica a 7,5% minimiza a formação de edema tissular.⁽²⁰⁾ A concentração de cloreto de sódio (NaCl) a 7,5% em soluções coloides (dextran 70 ou amido hidroxietílico) aumenta as propriedades farmacológicas dessas soluções hipertônicas em comparação ao uso da própria solução salina hipertônica a 7,5%.⁽²¹⁾

Comparamos os efeitos de um pequeno volume de solução salina hipertônica de NaCl a 7,5% aos da solução de NaCl isotônica a 0,9% no tratamento de isquemia intestinal e reperfusão. Analisamos o estresse oxidativo e sua correlação com a resposta inflamatória sistêmica em um modelo experimental de isquemia intestinal transitória em ratos. A hipótese foi de que a solução hipertônica tem mais benefícios potenciais no tratamento da isquemia intestinal.

MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e seguiu as diretrizes do Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*USA National Academy of Science*). Este estudo cumpriu as normas do *National Institute of Health* (NIH) sobre cuidados com animais. Animais com má recuperação clínica ou com sinais de sofrimento grave após a cirurgia sofreram eutanásia e foram contados como óbito em seus grupos de experimentação.

Procedimentos com os animais

Ratos machos Wistar com peso corpóreo de 250 a 300g (n=101) foram mantidos em jejum de alimentos durante uma noite, mas com acesso livre à água antes da experimentação. Sob anestesia geral (cloridrato de xilazina 2% por via intraperitoneal - ip - na dose de 5mg/kg de peso corpóreo antes de fenobarbital ip na dose de 50mg/kg de peso corpóreo), os ratos foram submetidos a intubação traqueal (cânula de polietileno, diâmetro interno de 1,7mm) e mantidos sob ventilação espontânea. Foram inseridos cateteres de polietileno (P10) na artéria carótida comum direita e na veia jugular externa direita. Os cateteres foram exteriorizados pela região dorsal.

Foi realizada uma incisão na linha média da parede do abdome. As vísceras abdominais foram manuseadas delicadamente para identificação da aorta abdominal e foi identificada a origem da artéria mesentérica superior (AMS). Nos grupos com isquemia, a AMS foi ocluída com uso de uma pinça microvascular junto à aorta abdominal. Os animais foram mantidos sob anestesia geral durante a oclusão da AMS. Animais com má recuperação clínica ou sinais de sofrimento foram sacrificados por meios humanos de eutanásia.

Delineamento do experimento

Os animais foram randomizados em quatro grupos: Grupo Falso, com animais sem oclusão da AMS e sem tratamento (n=20); Grupo SH 7,5%, com aqueles submetidos à oclusão da AMS e tratados com solução salina hipertônica a 7,5% (n=30); Grupo SF, com animais submetidos à oclusão da AMS e tratados com solução fisiológica 0,9% (n=30); e Grupo ST, com animais submetidos à oclusão da AMS mas não tratados com quaisquer das soluções (n=21). Os animais receberam as soluções por infusão pela veia jugular externa imediatamente após a liberação da pinça da AMS. A duração da oclusão da AMS foi de 45 minutos.

A dose de solução hipertônica foi de 4mL/kg, que é um nível já demonstrado eficaz na literatura. A dose de solução salina fisiológica foi de 32mL/kg. Esse volume de solução fisiológica teve a mesma quantidade de sódio, elemento que determina a expansão extracelular.

Foram coletadas amostras sequenciais de sangue imediatamente após a reperfusão da AMS, 2 e 4 horas após a reperfusão da AMS. Foi coletada uma amostra de sangue (0,5mL) dos animais de todos os grupos. As amostras de sangue foram centrifugadas (Centrifuge 5804 R[®], Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), e o plasma foi imediatamente congelado e armazenado em um congelador (-80°C), para posterior análise de citocinas.

Foram coletadas amostras dos pulmões (porções medianas), fígado (lobo direito) e intestino delgado (10cm proximal à válvula ileocecal) com congelamento rápido a -80°C em nitrogênio líquido, que foram armazenadas para análise posterior. Os animais foram submetidos à eutanásia após 2, 4 ou 6 horas após a reperfusão intestinal.

Ensaio de mieloperoxidase

Procedemos, então, ao ensaio de mieloperoxidase (MPO) como previamente descrito.^(22,23) Os tecidos foram homogeneizados (50mg/mL) em brometo de hexadeciltrimetilamônio em 10mM de ácido 3-*N*-morfolinopropanosulfônico (MOPS) e centrifugados a 15.000g por 40 minutos. A suspensão foi sonicada três vezes por 30 segundos. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de tetrametilbenzidina 1,6mM e com peróxido de hidrogênio 1mM. A atividade foi medida por espectrofotometria como a modificação na absorbância a 650nm a 37°C, utilizando um leitor de microplaca SpectraMax[®] (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos). Os resultados foram expressos como miliunidades de atividade de MPO por miligrama de proteína, determinadas pelo ensaio de Bradford.

Ensaio de malondialdeído

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi utilizada para quantificar a peroxidação lipídica nos tecidos e medida como previamente descrito para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.⁽²³⁾ Os tecidos foram homogeneizados (100mg/mL) em tampão de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Foi, então, adicionado um total de 100µL dos homogenizados a uma mistura de reação consistente de 750µL de ácido tiobarbitúrico, 100µL de sulfato dodecil sódico (SDS), 8,1%, 750µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 300µL de água destilada. A mistura foi aquecida a 90°C por 60 minutos. Após resfriamento

a 4°C, as amostras foram clareadas por centrifugação (10.000g, por 10 minutos) e sua absorbância foi medida a 532nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. O nível de peróxidos lipídicos foi expresso como µmol de malondialdeído/mg de proteína.⁽²³⁾

Interleucina 6 e interleucina 10

As concentrações de interleucina (IL) 10 e de IL-6 foram medidas em tecido pulmonar por ensaio de imunabsorção ligado a enzima (ELISA) utilizando *kit* DuoSet[®] (R&D Systems[®], Minneapolis, MN, Estados Unidos). Em resumo, amostras contendo 100mg de tecido (pulmões, fígado ou intestino delgado) foram homogeneizadas com uma solução de 100µL de KCl 1,15%. Foram utilizadas amostras do sobrenadante para a mensuração de IL-6 e IL-10, usando o método ELISA. As amostras foram lidas por espectrofotometria a 450nm usando um leitor de microplaca GENios Plus[®] (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Suíça). Os dados sobre as amostras de tecido são apresentados como pg/mg de proteína (ensaio de Bradford) e os dados plasmáticos apresentados como pg/mL.⁽²³⁾

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SigmaStat[®] 3.1 (Systat Software Inc, San Jose, Califórnia, Estados Unidos). Todos os dados foram apresentados como médias±desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por uma análise bicaudal da variância (ANOVA bicaudal) com o método de Holm-Šídák como teste *post-hoc*. A correlação entre IL-6 e IL-10 foi testada utilizando o método de Spearman. Valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Taxa de sobrevivência

Vinte animais foram submetidos à eutanásia. A taxa total de mortalidade para os grupos individuais foi: 12,12% para o Grupo Falso, 20% para o Grupo SH 7,5%, 12% para o Grupo SF e 27% para o Grupo ST. A mortalidade ocorreu dentro das 4 horas iniciais após a reperfusão e, em sua maioria, os casos ocorreram entre 2 e 4 horas após a reperfusão.

Peroxidação lipídica

Ocorreram valores significativamente mais baixos de malondialdeído (MDA) (Figura 1) nos grupos tratados (SF ou SH 7,5%) em comparação aos animais não

tratados em cada avaliação do estudo (2 horas, 4 horas ou 6 horas após a reperfusão). Além do mais, foi notável que os animais isquêmicos tratados tiveram níveis de MDA semelhantes aos encontrados nos animais do Grupo Falso.

Infiltração neutrofílica

Semelhantemente ao encontrado com relação à peroxidação lipídica, os grupos reperfundidos demonstraram valores basais de MPO (Figura 2), apesar do aumento apresentado pelos animais não tratados. A atividade de MPO foi utilizada como índice da infiltração neutrofílica.

Citocinas

Em todos os tecidos, as concentrações de IL-6 não diferiram entre os grupos 2 horas após a reperfusão. Após 4 horas, as concentrações de IL-6 foram significativamente mais elevadas no fígado e intestino dos Grupos ST e SF, em comparação com os Grupos Falso e SH 7,5%. Após 6 horas, não houve diferença entre os grupos, exceto com relação ao intestino, no qual as concentrações de IL-6 foram mais altas no Grupo ST (Figura 3).

Duas horas após a reperfusão, as concentrações tissulares de IL-10 não diferiram entre os grupos. Quatro horas após a reperfusão, as concentrações de IL-10 foram significativamente mais elevadas no fígado e intestino dos animais não tratados e daqueles tratados com solução salina fisiológica, em comparação aos animais sem tratamento e àqueles tratados com solução salina hipertônica a 7,5% (semelhante aos dados referentes à IL-6). Seis horas após a reperfusão, os níveis de IL-10 no fígado foram significativamente mais altos no grupo tratado com solução salina e nos animais não tratados, em comparação aos animais dos Grupos Falso e com SH 7,5%. Seis horas após a reperfusão, as concentrações de IL-10 encontradas no intestino de animais não tratados foram significativamente mais altas do que no de animais do Grupo Falso e do Grupo SH 7,5%. Seis horas após a reperfusão, os níveis de IL-10 encontrados nos pulmões foram significativamente mais altos nos animais tratados com solução salina hipertônica a 7,5% em comparação aos animais tratados com solução fisiológica (Figura 4).

As concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 foram avaliadas em três momentos intermediários (imediatamente após a reperfusão, 2 horas, e 4 horas após a reperfusão) e comparadas entre os grupos (Figura 5). Após o período inicial de 2 horas, a IL-6 teve concentrações plasmáticas significativamente mais altas em animais tratados com solução salina hipertônica a 7,5%. Além disso, nos animais tratados com solução

salina hipertônica a 7,5%, houve maior tendência a níveis mais baixos de IL-6 nos tecidos 4 horas após a reperfusão do que nos demais grupos.

Após 2 e 4 horas da reperfusão, as concentrações plasmáticas de IL-10 tiveram tendência a valores mais altos nos animais tratados com solução hipertônica do que nos demais grupos. Essas diferenças foram estatisticamente significantes na comparação aos animais do Grupo Falso em cada momento de avaliação. Houve uma forte correlação entre IL-6 e IL-10 nos tecidos (valor R nos pulmões=0,858; valor R no fígado=0,732; valor R no intestino=0,813) e uma moderada correlação nos níveis de citocinas plasmáticas (valor R=0,432) utilizando o método de Spearman (Figura 6).

DISCUSSÃO

Animais submetidos à oclusão da AMS receberam reposição intravascular de líquidos com soluções fisiológica ou hipertônica, imediatamente antes da reperfusão intestinal. Os efeitos de ambas as soluções foram comparados com dados de animais com tratamento falso e não tratados. Nossos resultados mostraram que o tratamento com fluidos cristaloides de animais isquêmicos causou uma diminuição significativa nos marcadores de estresse oxidativo e resposta inflamatória. A solução hipertônica promoveu um aumento retardado das citocinas no trato intestinal e no fígado. Houve um aumento importante da IL-10 no pulmão e no plasma, assim como de IL-6 no plasma.

A oclusão arterial de grandes territórios vasculares desencadeia mecanismos sistêmicos que reorganizam as condições fisiológicas.⁽²⁴⁾ Formulou-se a hipótese de que a infusão de soluções cristaloides imediatamente antes da reperfusão da AMS poderia proteger de alterações hemodinâmicas após restabelecimento do fluxo sanguíneo intestinal.^(4,24) O tratamento prévio com soluções cristaloides produz uma rápida e eficiente reperfusão intestinal.^(25,26)

O estresse oxidativo, a inflamação e os eventos anti-inflamatórios, que ocorrem imediatamente após a reperfusão, contribuem para o desfecho após isquemia da AMS.⁽²⁴⁾ Assim, escolhemos o período de 6 horas para avaliar o estresse oxidativo e a inflamação após isquemia intestinal transitória. Ambas as soluções cristaloides diminuíram o estresse e a resposta inflamatória estudados no território esplâncnico (intestino e fígado) e pulmões.

Nesse modelo, ocorre uma grave hipoperfusão no território esplâncnico, levando à isquemia intestinal.⁽¹⁵⁾ O tratamento com solução salina hipertônica a 7,5% proporciona resultados hemodinâmicos, comparáveis

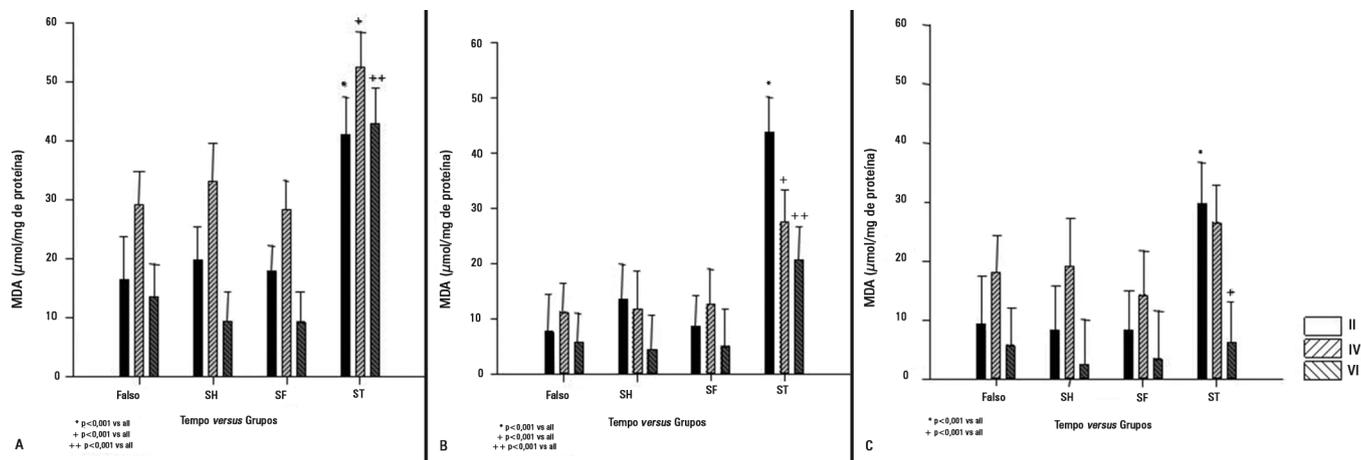


Figura 1 - Concentração tissular de malondialdeído ($\mu\text{mol/mg}$) em pulmões (A), fígado (B) e intestino (C) nos grupos com tratamento falso, tratado com solução hipertônica 7,5%, tratado com solução fisiológica e sem tratamento. Os gráficos demonstram a atividade de malondialdeído 2 horas (barra negra), 4 horas (barra cinza claro) e 6 horas (barra cinza escuro) após a reperusão. Isquemia e reperusão intestinal apresentaram um aumento de malondialdeído no pulmão, fígado e intestino; a infusão de volume (solução fisiológica e solução hipertônica) protegeu os tecidos contra estresse oxidativo. MDA - malondialdeído; SH - solução hipertônica; SF - solução fisiológica; ST - sem tratamento. * $p < 0,05$; resultados expressos por média \pm desvio padrão.

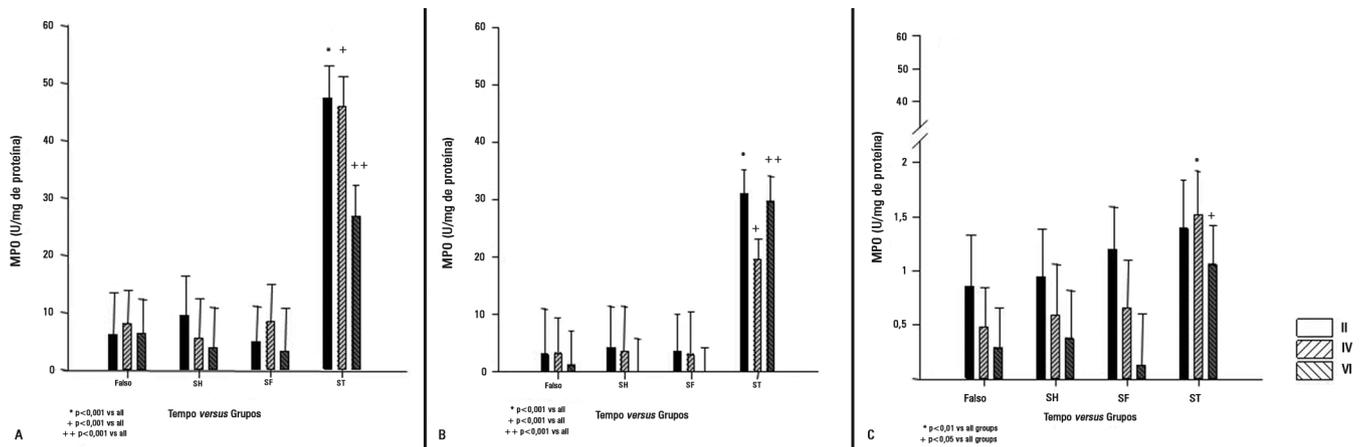


Figura 2 - Atividade de mieloperoxidase (U/mg) nos pulmões (A), fígado (B) e intestino (C) nos grupos com tratamento falso, tratado com solução hipertônica 7,5%, tratado com solução fisiológica e sem tratamento. Os gráficos demonstram a atividade de mieloperoxidase 2 horas (barra negra), 4 horas (barra cinza claro) e 6 horas (barra cinza escuro) após a reperusão. Isquemia e reperusão intestinal apresentaram um aumento da infiltração neutrofílica no pulmão, fígado e intestino; a infusão de volume (solução fisiológica e solução hipertônica) protegeu os tecidos, reduzindo a migração de células inflamatórias. MPO - mieloperoxidase; SH - solução hipertônica; SF - solução fisiológica; ST - sem tratamento. * $p < 0,05$; resultados expressos por média \pm desvio padrão.

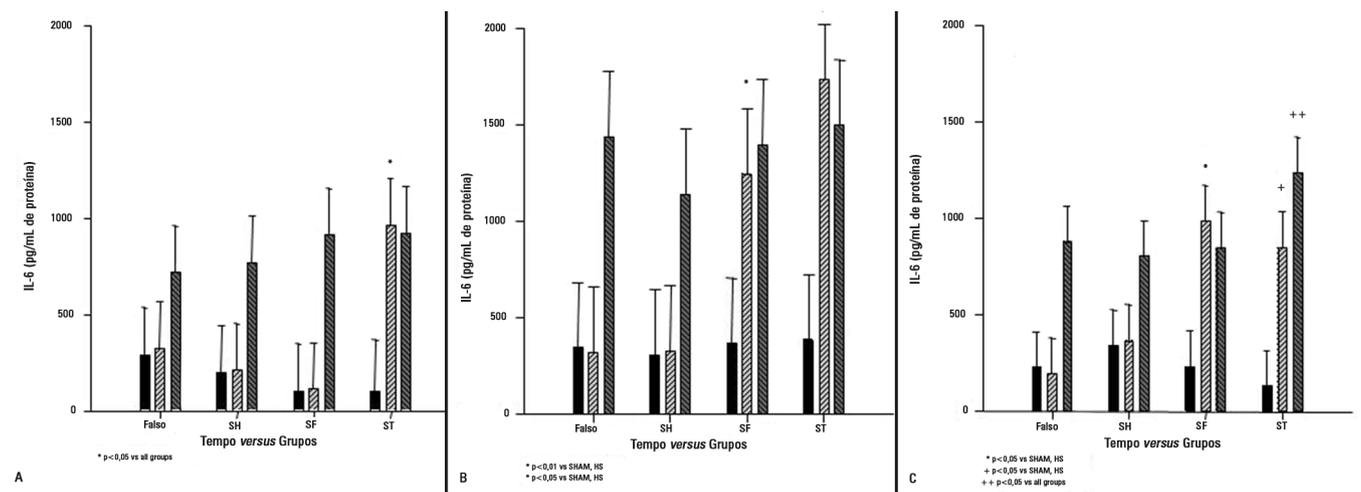


Figura 3 - Concentrações tissulares de interleucina 6 (pg/mg) nos pulmões (A), fígado (B) e intestino (C) nos grupos com tratamento falso, tratado com solução hipertônica 7,5%, tratado com solução fisiológica e sem tratamento. Os gráficos demonstram a concentração de interleucina 6 2 horas (barra negra), 4 horas (barra cinza claro) e 6 horas (barra cinza escuro) após a reperusão. Isquemia e reperusão intestinal apresentaram um aumento da quantidade de interleucina 6 no pulmão, fígado e intestino; a infusão de volume (solução fisiológica e solução hipertônica) protegeu os tecidos reduzindo a inflamação. IL-6 - interleucina 6; SH - solução hipertônica; SF - solução fisiológica; ST - sem tratamento. * $p < 0,05$; resultados expressos por média \pm desvio padrão.

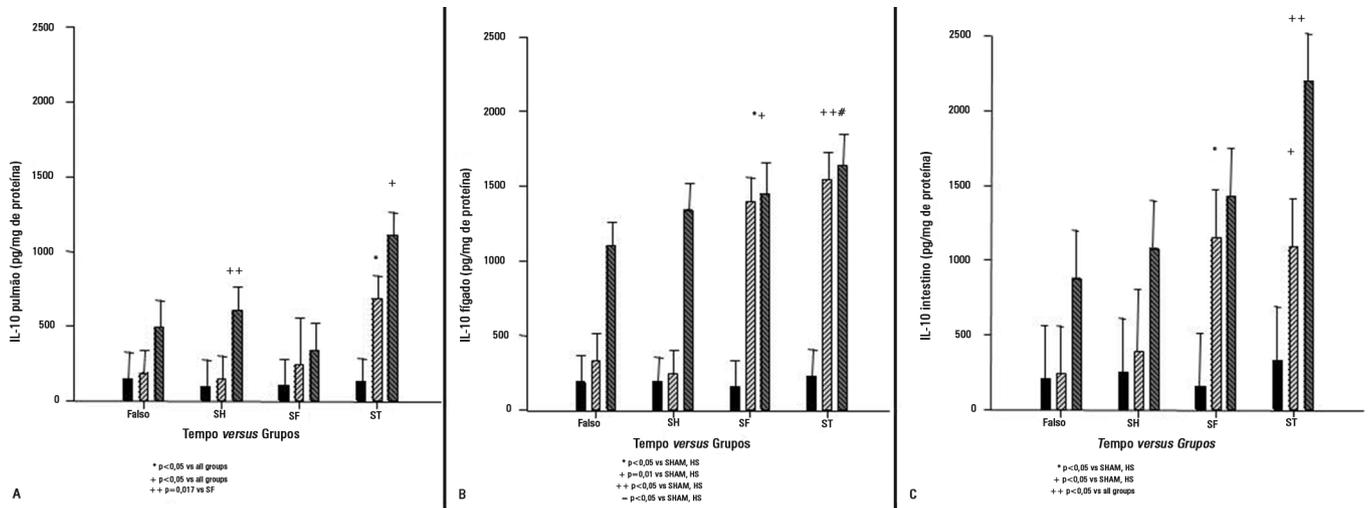


Figura 4 - Concentrações tissulares de interleucina 10 (pmol/mg) nos pulmões (A), fígado (B) e intestino (C) nos grupos com tratamento falso, tratado com solução hipertônica 7,5%, tratado com solução fisiológica e sem tratamento. Os gráficos demonstram as concentrações de interleucina 10 2 horas (barra negra), 4 horas (barra cinza claro) e 6 horas (barra cinza escuro) após a reperfusão. Isquemia e reperfusão intestinal apresentaram um aumento na quantidade de interleucina 10 no pulmão, fígado e intestino; a infusão de volume (solução fisiológica e solução hipertônica) reduziu a quantidade de inflamação conforme a interleucina 10. O grupo com solução fisiológica apresentou níveis mais altos de interleucina 10 no fígado e intestino, e com solução hipertônica apresentou níveis mais altos no pulmão. IL-10 - interleucina 10; SH - solução hipertônica; SF - solução fisiológica; ST - sem tratamento. * $p < 0,05$; resultados expressos por média \pm desvio padrão.

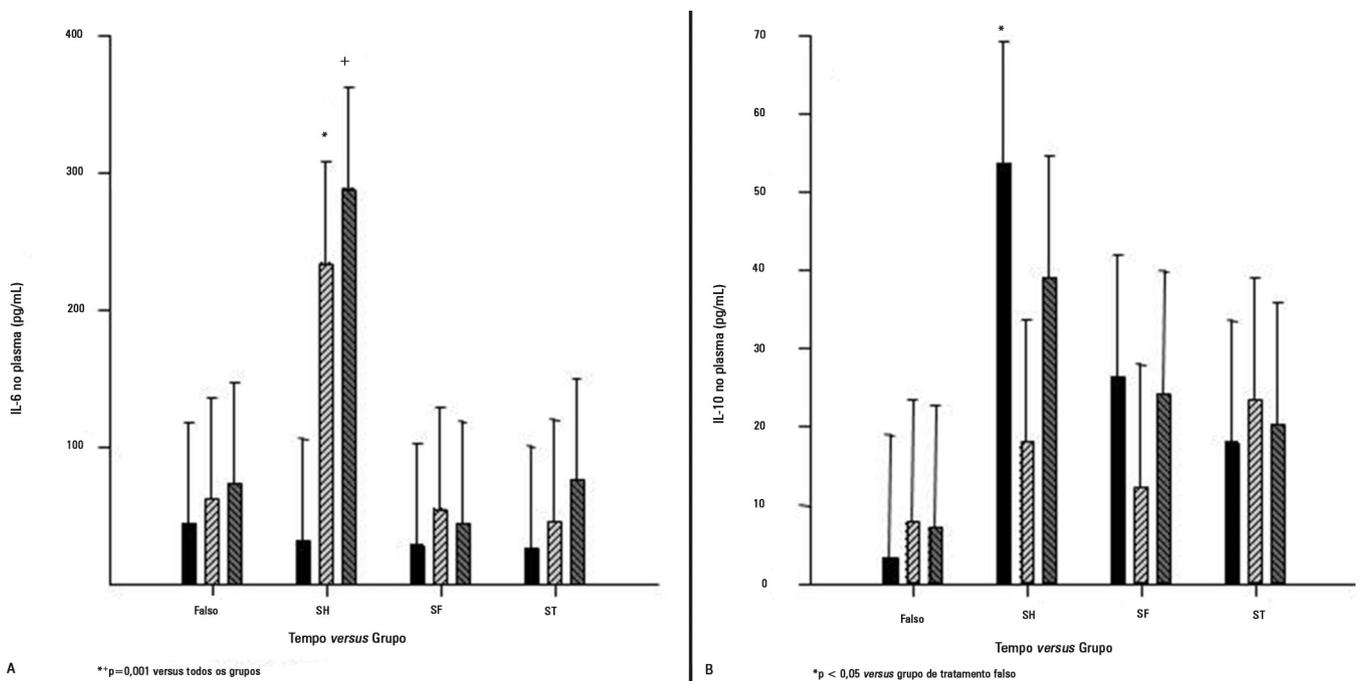


Figura 5 - Concentrações plasmáticas (pmol/mg) de interleucina 6 (A) e interleucina 10 (B) nos grupos de tratamento falso, tratado com solução hipertônica 7,5%, tratado com solução fisiológica e sem tratamento. Os gráficos demonstram as concentrações plasmáticas de interleucina 6 e interleucina 10 imediatamente antes da reperfusão (barra negra), 2 horas (barra cinza claro) e 4 horas (barra cinza escuro) após a reperfusão. Isquemia e reperfusão intestinal não apresentaram um aumento na quantidade de interleucina 6 ou interleucina 10 no plasma. A solução hipertônica apresentou níveis plasmáticos mais elevados de interleucina 6 e interleucina 10 do que sem tratamento e o grupo tratado com solução fisiológica. IL-6 - interleucina 6; IL-10 - interleucina 10; SH - solução hipertônica; SF - solução fisiológica; ST - sem tratamento. * $p < 0,05$; resultados expressos por média \pm desvio padrão.

aos tratamentos tradicionais e utilizando grandes quantidades de solução fisiológica.⁽²⁵⁾ Além disso, foi demonstrado que as respostas inflamatórias são mais bem atenuadas com solução salina hipertônica a 7,5% do que

com a infusão de solução fisiológica convencional.⁽¹⁵⁾ Nossos dados demonstraram padrão similar para isquemia intestinal e reperfusão. Tanto as características osmóticas quanto as hipertônicas da solução salina hipertônica a

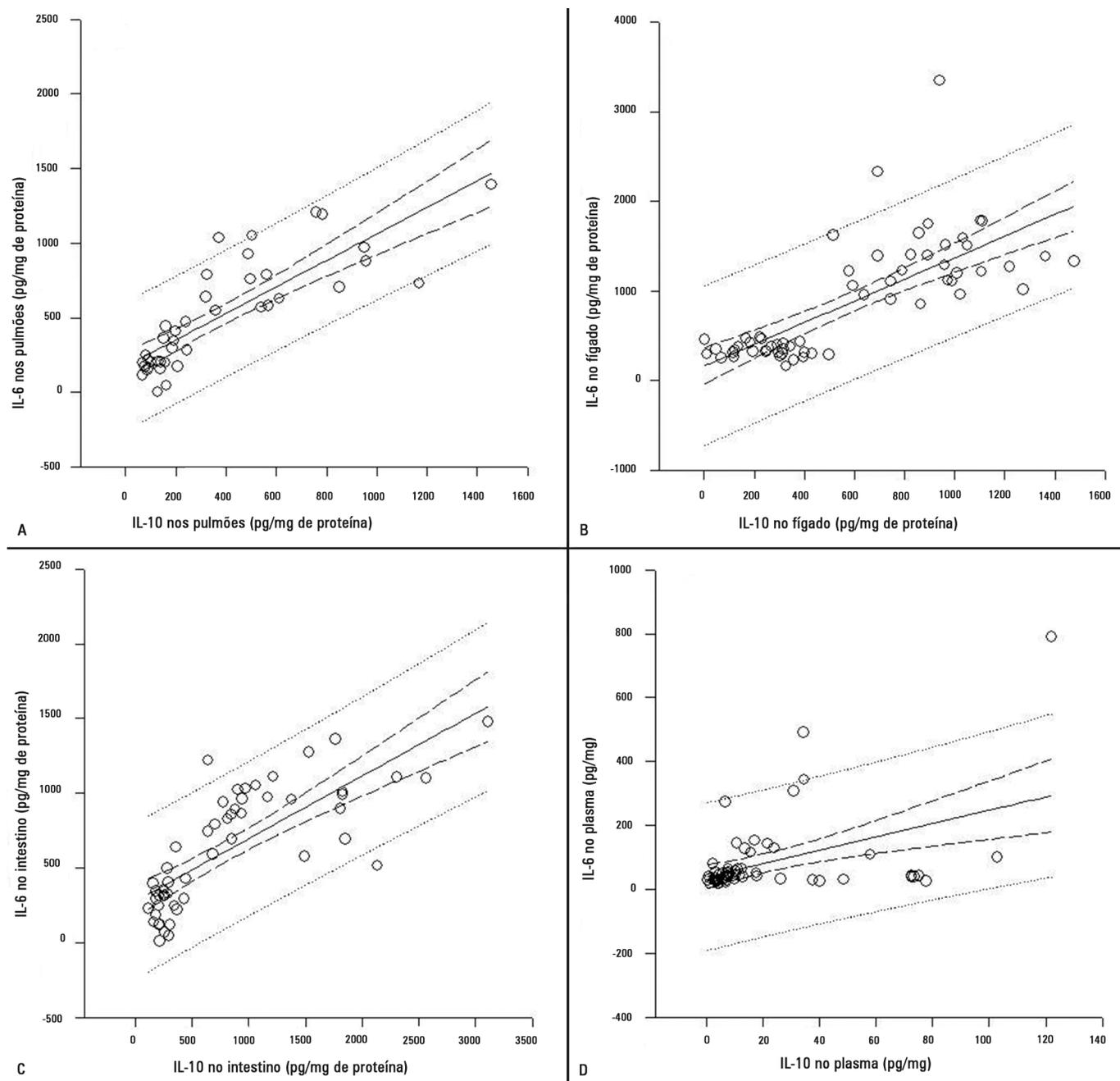


Figura 6 - Correlação entre os níveis de interleucina 6 e interleucina 10 (A) nos pulmões ($R=0,858$), (B) fígado ($R=0,732$), (C) intestino ($R=0,813$) e (D) plasma ($R=0,432$) em todos os grupos pelo método de Spearman. IL-6 - interleucina 6; IL-10 - interleucina 10. $p<0,05$.

7,5% foram associadas a esse efeito particular no presente modelo experimental.⁽²⁷⁾ Gonzalez et al. estudaram os efeitos terapêuticos de pequenos volumes de soluções salinas hipertônicas (4mL/kg de peso corpóreo) com diferentes concentrações de cloreto de sódio no modelo de oclusão da AMS em ratos. Os autores demonstraram que soluções salinas hipertônicas (2%, 5%, 7,5% ou 10%) diminuiriam a lesão intestinal e a infiltração neutrofílica

na mucosa intestinal. Os resultados obtidos com essas diferentes soluções hipertônicas foram similares àqueles obtido com volumes maiores de solução salina fisiológica (calculado à razão de 33mL/kg de peso corpóreo). Contudo, os autores obtiveram resultados melhores utilizando a solução salina hipertônica a 7,5%.⁽²⁸⁾

Em nosso estudo, um pequeno volume de solução salina hipertônica a 7,5% e um grande volume de

solução fisiológica tiveram efeitos similares na restauração dos parâmetros fisiológicos. Além disto, ambas as soluções atenuaram eficientemente o estresse oxidativo e a resposta inflamatória. É importante salientar que a solução hipertônica retardou a resposta inflamatória, efeito este que pode ser protetor. Os resultados obtidos com soluções cristaloides foram comparáveis àqueles obtidos nos animais operados com tratamento falso. É importante observar que, em nosso estudo, os animais com tratamento falso foram submetidos a um trauma cirúrgico moderado (incisão abdominal, manipulação das vísceras intestinais e da AMS). Esse trauma cirúrgico moderado foi suficiente para causar o estresse oxidativo e a resposta inflamatória, que foram observados em nossos resultados.^(29,30)

A lesão de reperfusão é relacionada a uma produção excessiva de ROS.⁽²⁾ Neste estudo, utilizou-se MDA como um marcador do estresse oxidativo. Nossos resultados mostraram que a produção de MDA em diferentes órgãos foi similar nos grupos com tratamento falso e verdadeiro. O estresse oxidativo, medido pela formação de MDA nos tecidos, foi significativamente mais intenso nos animais não tratados em cada um dos momentos de avaliação do estudo. Além do mais, as concentrações de MDA diminuíram com o passar do tempo em todos os grupos de experimentação. Esses dados mostraram que o estresse oxidativo foi reduzido pela reposição adequada do volume circulatório total.

A atividade de MPO foi analisada em diferentes órgãos, tanto da cavidade abdominal quanto extra-abdominal. A atividade de MPO foi amplamente utilizada como um indicador da infiltração neutrofílica nos tecidos.⁽²²⁾ No presente estudo, a atividade de MPO, nos Grupos SH 7,5% e SF, foi similar àquela medida nos animais com tratamento falso. Nos animais tratados, foram encontrados níveis de MPO significativamente menores do que nos animais não tratados. A infiltração leucocítica nos tecidos se associou com a síntese local de quimocinas e citocinas.⁽³¹⁾ As diferentes IL têm tanto ações inflamatórias quanto anti-inflamatórias.⁽³²⁾

Concentrações de IL-6 (pró-inflamatória) e IL-10 (anti-inflamatória) foram analisadas em diferentes órgãos, sendo estudado um perfil temporal das concentrações plasmáticas dessas IL. Muitos estudos propuseram que a síntese de IL-10 poderia ser regulada pela produção de IL-6 e, também, que sua proporção poderia prever o desfecho clínico.⁽³²⁻³⁶⁾ As concentrações de IL-6 e IL-10 nos tecidos foram muito similares entre os animais tratados com solução salina hipertônica a 7,5% e os com cirurgia falsa

durante o período de tempo estudado. A análise dos níveis de IL-6 e IL-10 nos tecidos em animais tratados com solução fisiológica teve um pico no fígado e no intestino delgado em pelo menos um dos momentos de avaliação do estudo, em comparação com os Grupos Falso e SH 7,5%. Quatro horas após a reperfusão, houve tendência a concentrações tissulares mais elevadas de IL-6 e IL-10 no grupo não tratado. A despeito dos resultados gerais das IL nos tecidos, as concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 foram mais altas nos animais tratados com solução salina hipertônica a 7,5%. Há alguns dados que mostram que a solução hipertônica teve uma ação anti-inflamatória, aumentando a IL-10. Além disso, o aumento da IL-10, no plasma e no pulmão, pode explicar a menor infiltração neutrofílica e o menor estresse oxidativo no pulmão.

Analisamos dois importantes mecanismos de lesão que ocorrem após a isquemia intestinal transitória em ratos. Os resultados dos parâmetros hemodinâmicos e das análises bioquímicas foram similares após o tratamento com infusão de soluções cristaloides. Entretanto, o desfecho clínico nos animais tratados com solução salina hipertônica a 7,5% apresentou tendência a menor sobrevivência, quando comparados aos animais tratados com solução fisiológica - a diferença, porém, não foi significativa.

Este estudo teve algumas limitações. Não pudemos analisar um período longo após a isquemia, em razão da dificuldade em manter os animais e por razões éticas. Além disso, a isquemia mesentérica necessita de uma infusão de volume com base diária e a repetição da solução hipertônica pode apresentar hipernatremia como complicação. O ponto forte deste estudo foi comparar a vantagem dos estudos experimentais na reprodução de exatamente o mesmo cenário, para assegurar-se das ações terapêuticas de alguns compostos.

CONCLUSÃO

Em conclusão, utilizando um modelo de isquemia intestinal transitória em ratos, identificamos que o tratamento com um pequeno volume de solução salina hipertônica a 7,5% atenua a formação de espécies reativas de oxigênio bem como as respostas inflamatórias em diferentes órgãos. A solução hipertônica apresentou níveis mais elevados de interleucina 10 no plasma e no tecido pulmonar, tornando o equilíbrio favorável a um perfil anti-inflamatório. Os efeitos da solução salina hipertônica foram similares àqueles obtidos com a infusão de volumes maiores de solução fisiológica. A vantagem da solução salina hipertônica a 7,5% em relação à fisiológica foi a produção de menos edema.

Contribuições dos autores

Wilson Kohama Chimabucuro foi o responsável por todas as análises e conteúdo do artigo. Bomfim Alves da Silva Junior contribuiu para a elaboração do artigo. Ana

Iochabel Soares Moretti contribuiu com a análise bioquímica. Ester Correia Sarmiento Rios contribuiu com ajustes no artigo. Irineu Tadeu Velasco e Francisco Garcia Soriano foram responsáveis pela ideia e projeto.

ABSTRACT

Objective: We investigated the effect of two different saline solutions on the mechanisms of injury after intestinal ischemia: oxidative stress and inflammatory responses.

Methods: Wistar rats underwent transient superior mesenteric artery occlusion and were studied for 6 hours after reperfusion. After randomization, the animals were divided into four groups: Sham; Hypertonic Saline, in which they received infusion of 4mL/kg body weight of 7.5% hypertonic saline; Saline, in which they received infusion of 33mL/kg body weight of 0.9% saline; and Non Treatment. The infusion was performed immediately prior to the reperfusion. The plasma concentrations of interleukin 6 and interleukin 10 were measured. Tissue samples (lung, liver, and intestine) were collected for malondialdehyde, myeloperoxidase, and interleukin measurements.

Results: The animals that received infusions (Hypertonic Saline and Saline) showed lower levels of tissue malondialdehyde, myeloperoxidase, interleukin 6, and interleukin 10 compared with the Non Treatment group. The plasma concentrations of interleukin 6 and interleukin 10 were higher in the animals treated with 7.5% hypertonic saline compared with Saline and Non Treatment groups.

Conclusion: In this model of transient intestinal ischemia, the adequate maintenance of intravascular volume decreased oxidative stress and the synthesis of inflammatory markers. Both 7.5% Hypertonic Saline and Saline attenuated the deleterious effects observed after intestinal ischemia.

Keywords: Saline solution, hypertonic/administration & dosage; Reperfusion injury/drug therapy; Mesenteric artery, superior; Inflammation; Ischemia; Interleukins; Oxidative stress; Rats, Wistar

REFERÊNCIAS

1. Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today*. 2005;35(3):185-95.
2. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*. 2005;20(4):336-43. Review.
3. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med*. 2004;164(10):1054-62.
4. Khanna A, Rossman JE, Fung HL, Caty MG. Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 2001;99(1):114-9.
5. Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, et al. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroenterol*. 2005;11(35):5485-91.
6. Xu DZ, Lu Q, Kubicka R, Deitch EA. The effect of hypoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. *J Trauma*. 1999;46(2):280-5.
7. Lammers KM, Innocenti G, Venturi A, Rizzello F, Helwig U, Bianchi GP, et al. The effect of transient intestinal ischemia on inflammatory parameters. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18(1):78-85.
8. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*. 1993;21(9):1376-86.
9. Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, et al. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg*. 2005;40(3):470-7.
10. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):321-7.
11. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol*. 1980;239(5):H664-73.
12. Kolsen-Petersen JA. Immune effect of hypertonic saline: fact or fiction? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48(6):667-78.
13. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005;60(2):159-72.
14. Jonas J, Heimann A, Strecker U, Kempinski O. Hypertonic/hyperoncotic resuscitation after intestinal superior mesenteric artery occlusion: early effects on circulation and intestinal reperfusion. *Shock*. 2000;14(1):24-9.
15. Gonzalez EA, Kozar RA, Suliburk JW, Weisbrodt NW, Mercer DW, Moore FA. Hypertonic saline resuscitation after mesenteric ischemia/reperfusion induces ileal apoptosis. *J Trauma*. 2005;59(5):1092-8.
16. Zakaria el R, Tsakadze NL, Garrison RN. Hypertonic saline resuscitation improves intestinal microcirculation in a rat model of hemorrhagic shock. *Surgery*. 2006;140(4):579-87; discussion 587-8.
17. Suzuki K, Aoyagi S, Koie H, Asano R. The effect of 7.2% hypertonic saline solution on m-mode echocardiographic indices in normovolemic dogs. *J Vet Med Sci*. 2006;68(7):749-51.
18. Attuwaybi B, Kozar RA, Gates KS, Moore-Olufemi S, Sato N, Weisbrodt NW, et al. Hypertonic saline prevents inflammation, injury, and impaired intestinal transit after gut ischemia/reperfusion by inducing heme oxygenase 1 enzyme. *J Trauma*. 2004;56(4):749-58; discussion 758-9.
19. Kolsen-Petersen JA. Immune effect of hypertonic saline: fact or fiction? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48(6):667-78.
20. Victorino GP, Newton CR, Curran B. Effect of hypertonic saline on microvascular permeability in the activated endothelium. *J Surg Res*. 2003;112(1):79-83.

21. Chiara O, Pelosi P, Brazzi L, Bottino N, Taccone P, Cimbanassi S, et al. Resuscitation from hemorrhagic shock: experimental model comparing normal saline, dextran, and hypertonic saline solutions. *Crit Care Med.* 2003;31(7):1915-22.
22. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* (1985). 1985;59(6):1978-85.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
24. Hayward R, Lefer AM. Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1998;275(6 Pt 2):H2080-6.
25. Choi PT, Yip G, Quinonez LG, Cook DJ. Crystalloids vs. colloids in fluid resuscitation: a systematic review. *Crit Care Med.* 1999;27(1):200-10.
26. Bagshaw SM, Bellomo R. The influence of volume management on outcome. *Curr Opin Crit Care.* 2007;13(5):541-8.
27. Drobin D, Hahn RG. Kinetics of isotonic and hypertonic plasma volume expanders. *Anesthesiology.* 2002;96(6):1371-80.
28. Gonzalez EA, Kozar RA, Suliburk JW, Weisbrodt NW, Mercer DW, Moore FA. Conventional dose hypertonic saline provides optimal gut protection and limits remote organ injury after gut ischemia reperfusion. *J Trauma.* 2006;61(1):66-73; discussion 73-4.
29. Thomas S, Karnik S, Balasubramanian KA. Surgical manipulation of the small intestine and its effect on the lung. *J Surg Res.* 2002;106(1):145-56.
30. Grotz MR, Ding J, Guo W, Huang Q, Deitch EA. Comparison of plasma cytokine levels in rats subjected to superior mesenteric artery occlusion or hemorrhagic shock. *Shock.* 1995;3(5):362-8.
31. Salmi M, Jalkanen S. Molecules controlling lymphocyte migration to the gut. *Gut.* 1999;45(1):148-53. Review.
32. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzuki S, Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 1999;27(7):1262-4.
33. Rajappa M, Sen SK, Sharma A. Role of pro/anti-inflammatory cytokines and their correlation with established risk factors in South Indians with coronary artery disease. *Angiology.* 2009;60(4):419-26.
34. Zingarelli B, Yang Z, Hake PW, Denenberg A, Wong HR. Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischaemic injury in mice intestine. *Gut.* 2001;48(5):610-22.
35. Dugernier TL, Laterre PF, Wittebole X, Roeseler J, Latinne D, Reynaert MS, et al. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(2):148-57.
36. Wang W, Smail N, Wang P, Chaudry IH. Increased gut permeability after hemorrhage is associated with upregulation of local and systemic IL-6. *J Surg Res.* 1998;79(1):39-46.