

ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICA TOTAL ASSOCIADA AO ESTADO DE CHOQUE HEMORRÁGICO CONTROLADO: EFEITOS NO SEQÜESTRO DE NEUTRÓFILOS NO ÍLEO TERMINAL E CÓLON SIGMÓIDE DO RATO

TOTAL HEPATIC WARM ISCHEMIA AND REPERFUSION ASSOCIATED WITH CONTROLLED HEMORRHAGIC SHOCK: EFFECTS OF NEUTROPHIL SEQUESTRATION IN DISTAL ILEUM AND SIGMOID COLON OF RATS

Mauro José Fontelles, TCBC-SP¹
Mario Mantovani, TCBC-SP²

RESUMO: Objetivo: Estudar os efeitos da isquemia e reperfusão hepática total sobre acúmulo de neutrófilos no íleo terminal e cólon sigmóide de ratos, em condições de normalidade e submetidos ao estado de choque hemorrágico controlado. **Método:** 32 ratos Wistar, machos, foram divididos em quatro grupos de oito animais cada: grupo Sham, submetido aos procedimentos padrões com um período de 60 minutos de observação; grupo Choque, submetido a choque hemorrágico controlado (PAM = 40mmHg, 20min) seguido de reposição volêmica (Ringer lactato + sangue, 3:1) e reperfusão (60min); grupo Pringle, submetido à isquemia hepática total (15min.) e reperfusão (60min); grupo Total submetido a choque hemorrágico controlado (20min) seguido de reposição volêmica (Ringer lactato + sangue, 3:1), isquemia hepática (15min) e reperfusão (60min). Após o sacrifício dos animais, procedeu-se à contagem de neutrófilos nos segmentos intestinais. **Resultados:** Na contagem de neutrófilos no íleo terminal, apenas o grupo Choque diferiu dos demais ($p < 0.001$) os quais não diferiram entre si (Sham 1.33 ± 0.55 , Choque 5.48 ± 2.65 , Pringle 2.47 ± 1.38 , Total 2.44 ± 0.56) e, no cólon sigmóide, o grupo Choque diferiu apenas do grupo Sham ($p = 0.021$), sem diferença entre os demais (Sham 0.66 ± 0.44 , Choque 2.08 ± 1.11 , Pringle 1.04 ± 0.71 , Total 1.21 ± 1.03). **Conclusão:** Diferentemente do estado de choque hemorrágico controlado, a isquemia hepática de 15 minutos, seguida de 60 minutos de reperfusão, não causou acúmulo significativo de neutrófilos no íleo terminal e cólon sigmóide.

Descritores: Isquemia; Reperfusão; Choque Hipovolêmico; Manobra de Pringle; Neutrófilos.

INTRODUÇÃO

O trauma hepático constitui a forma mais comum de trauma abdominal fechado, superado apenas pela lesão do baço¹. Embora a maioria das lesões hepáticas apresente-se em pequenas dimensões, algumas, de maior gravi-

dade, podem ser letais se a hemorragia não for adequadamente controlada.

Enquanto a causa mais comum de morte nas lesões hepáticas extensas continua sendo a hemorragia, os pacientes que sobrevivem ao trauma inicial podem evoluir para outras complicações inerentes às alterações induzi-

1. Doutor em Cirurgia do Trauma. Cirurgião do Hospital do Pronto-Socorro Municipal de Belém. Professor da Disciplina de Anatomia Humana da Universidade da Amazônia — UNAMA.
2. Professor Titular e Chefe da Disciplina de Cirurgia do Trauma da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Coordenador do Laboratório de Investigação em Cirurgia do Trauma (LICIT) do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM — UNICAMP.

Recebido em 19/07/2001

Aceito para publicação em 05/03/2002

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação em Cirurgia do Trauma (LICIT) da Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP — Campinas, S.P., no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM-UNICAMP.

das pelo estado de choque hemorrágico, traduzidas pela síndrome de isquemia e reperusão (I/R) a que estão sujeitos no decurso do controle da lesão exsanguinante.

Assim, o clampeamento da tríade portal, conhecido como manobra de Pringle, é o procedimento cirúrgico padrão mais comumente utilizado pelos cirurgiões para reduzir o risco de hemorragia maciça durante a abordagem cirúrgica do fígado, especialmente nas lesões traumáticas extensas, o que provoca um acúmulo de sangue no leito esplâncnico, sendo o intestino submetido a um período de isquemia transitória, seguida de reperusão, condição esta que tem sido apontada como o mais importante mecanismo envolvido na instalação da síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) e insuficiência de múltiplos órgãos e sistemas (IMOS) em pacientes traumatizados²⁻⁴.

Quando ocorre choque hemorrágico associado, este um potente estímulo causador de alterações sobre a fisiologia da parede intestinal, esta condição é agravada, levando a importantes repercussões locais e também em órgãos distantes, como o fígado e pulmão^{5,6}.

Isto posto, o objetivo deste trabalho experimental foi estudar o efeito da I/R hepática total, em condições de normalidade e sob estado de choque hemorrágico controlado, no acúmulo de neutrófilos no íleo terminal e cólon sigmóide do rato.

MÉTODO

Todos os procedimentos seguiram a orientação de protocolo previamente estabelecido segundo o projeto-piloto elaborado e desenvolvido pela Disciplina de Cirurgia do Trauma e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Neste experimento, foram utilizados 32 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar (CEMIB UNICAMP, Campinas, SP), com pesos que variaram de 185 a 250 gramas ($212,65 \pm 20,79$) e com idade aproximada de oito semanas. Todos os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de luminosidade e temperatura, recebendo dieta padrão do LICIT constituída de ração NUVILAB CR-1 (Nuvital Nutrientes Ltda., Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. Um período prévio de permanência de uma semana, antes do início do experimento, foi instituído objetivando a aclimação dos animais ao biotério.

Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos de oito animais cada:

- **Grupo Sham** — Ratos em condições de normalidade, submetidos, unicamente, à laparotomia e, posteriormente, a um período de 60 minutos de observação, equivalente ao período de reperusão nos demais grupos;
- **Grupo Choque** — Ratos submetidos à sangria com instalação do estado de choque hemorrágico controlado, com pressão arterial média (PAM) mantida em 40mmHg, por um período de 20 minutos, seguido da reposição volêmica com solução de Ringer lactato e

sangue total (3: 1) até atingir a PAM de 80mmHg, com posterior período de reperusão de 60 minutos.

- **Grupo Pringle** — Ratos submetidos à laparotomia seguida por 15 minutos de manobra de Pringle e posterior período de reperusão hepática total de 60 minutos.
- **Grupo Total** — Ratos submetidos à sangria com instalação do estado de choque hemorrágico controlado, com PAM mantida em 40mmHg, por um período de 20 minutos, seguido da reposição volêmica com solução de Ringer Lactato e sangue total (3 : 1) até atingir a PAM de 80mmHg. A seguir, foram submetidos à laparotomia e 15 minutos de manobra de Pringle, seguida de reperusão hepática total por um período de 60 minutos.

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas na noite anterior ao experimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia intraperitoneal (IP) com uma solução de cloridrato de cetamina, 80mg/kg (Cristália, Itapira, SP) + cloridrato xilazina, 10mg/kg (Bayer S.A., São Paulo, SP) e, sulfato de atropina (Halex Istar, São Paulo, SP) 0,05mg/kg. Oxigênio foi administrado num fluxo de 2l/min, fornecido sob campânula plástica semi-aberta. Após indução anestésica, realizaram-se depilação e os animais foram, então, colocados em posição supina sobre prancha com aquecimento elétrico controlado.

Usando-se técnica asséptica, a artéria carótida direita e veia jugular direita foram dissecadas e cateterizadas com cateteres de polietileno (PE 40), previamente heparinizados. A artéria foi utilizada para efetivação da sangria com estabelecimento do estado de choque hemorrágico controlado, além da coleta de amostras de sangue e, a veia, para reposição volêmica. A seguir, a artéria femoral direita foi dissecada e cateterizada com cateter de polietileno (PE 40), heparinizado, para controle da pressão arterial média dos animais (Registrador Mingograf 804, Siemens-Elema, Alemanha).

Durante todas as fases do experimento, as seguintes variáveis foram monitorizadas continuamente: eletrocardiograma (ECG), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR), a qual foi mantida entre 36°C – 38°C, controlada por aquecimento externo. Medidas das pressões parciais do gás carbônico (pCO₂) e do oxigênio (pO₂), dos eletrólitos (sódio, potássio), da reserva de base (BE), do lactato e pH sanguíneos, todos arteriais, foram obtidas após estabilização dos sinais vitais iniciais (SVI), no início da fase de reperusão (RP0), aos 30 minutos de reperusão (RP30) e aos 60 minutos de reperusão (RP60).

As variáveis utilizadas para caracterizar o estado de choque hemorrágico controlado com baixa perfusão tecidual incluíram as medidas do pH, da reserva de base e dosagem do lactato sérico, todas colhidas em amostras de sangue arterial.

A instalação do choque hemorrágico controlado foi obtida pela sangria, a intervalos regulares, de volumes equivalentes a 5% da volemia, até a obtenção dos níveis pressóricos iguais a 40mmHg de PAM para os animais do grupo Choque e grupo Total. Retiradas posteriores foram efetuadas, quando necessário. A laparotomia mediana foi realizada com hemostasia rigorosa dos vasos sanguíneos.

O ligamento hepatoduodenal (artéria hepática, veia porta e ducto biliar) foi identificado e pinçado (manobra de Pringle) com clampe arterial delicado. Após o período de reperusão de 60 minutos os animais foram sacrificados por exsanguinação.

Em seguida à inspeção da cavidade abdominal, o procedimento de “lavagem” dos vasos sanguíneos foi iniciado. Para tanto, a aorta foi pinçada imediatamente abaixo do diafragma torácico e a veia porta seccionada no seu trajeto ao longo do ligamento hepatoduodenal, de modo a permitir a drenagem do excedente de líquidos resultantes desta “lavagem”. Pela artéria femoral direita injetou-se, de maneira suave, 40ml de solução fisiológica com a finalidade de remover, do leito dos vasos sanguíneos intestinais, quaisquer resquícios de sangue ali contidos.

Após esta etapa, foram retirados dois fragmentos intestinais, cada um com cerca de 3cm de comprimento, correspondendo à porção do íleo terminal distante dois centímetros da valva ileocecal e porção mais distal do cólon sigmóide. Cada fragmento foi previamente lavado em solução salina fisiológica, fixado em formalina a 10% e embebido em parafina. Cortes histológicos de quatro micrômetros, no sentido longitudinal de cada segmento intestinal, foram feitos e depois submetidos à coloração pela técnica de hematoxilina/eosina, para estudo histológico dos tecidos e contagem do número de neutrófilos por campo na lâmina própria da camada mucosa. A escolha destes dois segmentos intestinais se deu em razão da I/R, causada pela oclusão do ligamento hepatoduodenal, atingir indistintamente estas duas porções, além de o íleo terminal representar a parte mais sensível à isquemia e o cólon sigmóide a de maior contaminação bacteriana.

A leitura das lâminas foi realizada de maneira aleatória e o resultado final da contagem de neutrófilos, em cada corte, foi obtido pela média aritmética dos valores relativos a dez campos microscópicos, com aumento de 400 X, alternando-se dois campos sem leitura para cada campo considerado.

Nas comparações entre os grupos a significância estatística foi avaliada através da Análise de Variância (ANOVA de um critério – Teste F). Na presença de diferenças entre os grupos, estas foram identificadas pelo método de Student-Newman-Kuels. Adotou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) e os valores estão representados sob a forma de média \pm desvio padrão da média. Os valores de “p” foram obtidos através do programa estatístico SAS – versão 6.12 (Statistical Analysis System Software – Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Neste experimento, os grupos foram homogêneos, pois não ocorreram diferenças significativas quanto aos pesos dos animais estudados. O peso médio \pm desvio padrão, de cada grupo, está representado na Tabela 1.

Variáveis pré-operatórias

Em todos os animais, as variáveis de interesse, avaliadas no pré-operatório, encontravam-se dentro dos limites de normalidade. Exceto pela dosagem da pressão parcial do dióxido de carbono no sangue arterial (pCO_2), não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, demonstrando que todos os animais foram retirados da mesma população. Os valores da média \pm desvio padrão, para cada grupo estudado, estão representados na Tabela 2.

Evolução hemodinâmica

Para cada grupo, e durante todas as fases de cada experimento, as medidas da PAM, FR e FC foram obtidas para avaliar a evolução hemodinâmica dos animais. As análises estatísticas destas variáveis foram feitas nas seguintes fases: sinais vitais iniciais (SVI), início da reperusão (RP0), reperusão 30 minutos (RP30) e reperusão 60 minutos (RP60). O Gráfico 1 ilustra, mais detalhadamente, a média dos valores da PAM nos diferentes grupos, ao longo de todo o experimento.

Na comparação entre os valores da PAM no início do experimento (SVI) não foi verificada qualquer diferença significativa entre os diferentes grupos ($p = 0.265$), estando todos equiparados quanto aos valores desta variável hemodinâmica.

Na fase inicial da reperusão (RP0), todos os grupos apresentavam PAM significativamente diferentes ($p < 0.0001$), exceto entre os grupos Pringle e Total ($p = 0.123$), que evoluíram com valores muito próximos (43.25 ± 3.01 mmHg e 46.00 ± 3.46 mmHg) e bem abaixo dos demais grupos. Aos 30 minutos de reperusão (RP30) apenas o grupo Sham apresentava diferença significativa com os demais grupos, com PAM apresentando valor superior a estes ($96,5 \pm 14.8$ mmHg). Após 60 minutos de reperusão (RP60) a medida da PAM mostrou-se novamente diferente apenas no grupo Sham que, como já vimos, apresentou valores acima dos demais grupos durante todo o experimento, exceto nos sinais vitais iniciais (SVI).

Tabela 1
Peso dos animais conforme o grupo estudado

Grupo	Sham	Choque	Pringle	Total
Média (g)	201,25	216,25	216,87	221,25
Desvio Padrão	12,74	27,35	16,88	22,79
N	8	8	8	8

(ANOVA: $p = 0.258$).

Tabela 2
Valores médios das variáveis pré-operatórias conforme o grupo estudado.

Variável \ Grupo	Sham	Choque	Pringle	Total	P*
PAM (mmHg)	118,75 ± 17,91	126,75 ± 17,46	136,50 ± 14,88	128,25 ± 19,16	0,265
FR (mov./min)	60,25 ± 8,58	58,00 ± 4,78	63,50 ± 16,48	63,50 ± 6,90	0,648
FC (bpm)	310,50 ± 28,27	292,50 ± 40,02	307,50 ± 15,62	312,00 ± 19,24	0,478
pH	7.329 ± 0,062	7.257 ± 0,059	7.311 ± 0,049	7.295 ± 0,033	0,059
pCO ₂ (mmHg)	49,15 ± 6,52	57,67 ± 9,50	48,48 ± 3,00	52,66 ± 5,45	0,035
pO ₂ (mmHg)	208,25 ± 118,62	240,37 ± 68,62	161,75 ± 92,68	222,00 ± 99,11	0,421
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	27,25 ± 3,98	25,37 ± 2,23	24,81 ± 1,75	25,57 ± 1,30	0,269
BE (mmol/l)	0,02 ± 2,18	-2,23 ± 1,90	-1,46 ± 2,37	-1,00 ± 1,15	0,161
Na ⁺ (mEq/l)	136,00 ± 8,01	132,14 ± 4,14	129,37 ± 8,95	133,62 ± 10,33	0,444
K ⁺ (mEq/l)	4,92 ± 0,59	4,30 ± 0,74	4,93 ± 0,58	4,60 ± 0,72	0,201
Lactato (mmol/l)	0,92 ± 0,12	0,95 ± 0,19	0,91 ± 0,20	0,85 ± 0,14	0,678

*Análise de Variância (ANOVA). PAM – Pressão arterial média; FR – Frequência respiratória; FC – Frequência cardíaca.

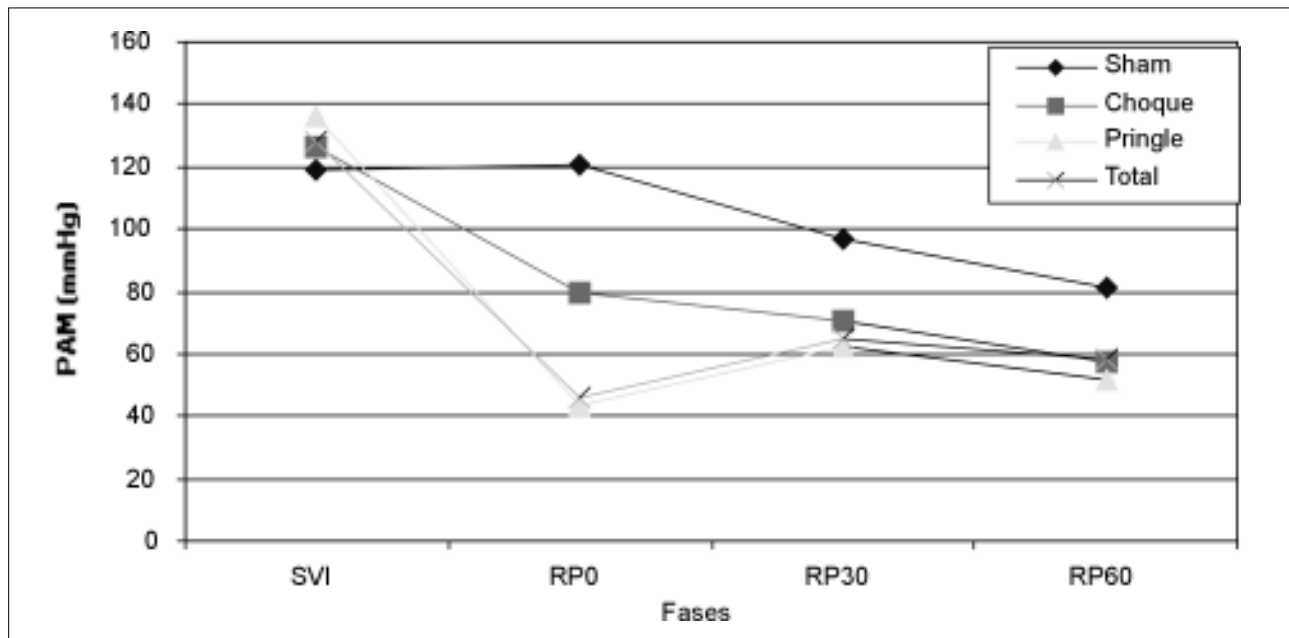


Gráfico 1 — Valores da PAM em cada fase do experimento conforme o grupo estudado. SVI — Sinais vitais iniciais RP0 — Reperusão 0 min. RP30 — Reperusão 30 min. RP60 — Reperusão 60 min.

Seqüestro de neutrófilos

O número de neutrófilos por campo, presente no íleo terminal, em cada grupo, após 60 minutos de reperusão, está representado na Tabela 3. A análise de comparação múltipla mostrou que, após o período de 60 minutos de reperusão (RP60), ocorreu diferença estatisticamente significativa quanto aos valores relativos às contagens de neutrófilos por campo, no íleo terminal, nos diferentes grupos estudados ($p < 0,001$). Na análise de comparação dois

a dois verifica-se que apenas o grupo Choque apresentou diferença significativa quando comparado aos demais, os quais não diferiram entre si. O grupo Sham foi o que apresentou menor contagem, porém, sem diferir dos grupos Pringle e Total.

O número de neutrófilos por campo, presente no cólon sigmóide, em cada grupo, após 60 minutos de reperusão, está representado na Tabela 4. A análise de comparação múltipla mostrou que, após o período de 60 mi-

Tabela 3
Número de neutrófilos por campo, no fêo terminal, conforme o grupo estudado

<i>PMN/Campo</i> \ <i>Grupo</i>	<i>Sham</i>	<i>Choque</i>	<i>Pringle</i>	<i>Total</i>
Média	1,33	5,48	2,47	2,44
DP	0,55	2,65	1,38	0,56
N	8	8	7	7

ANOVA: $p < 0.001$ PMN – Polimorfonucleares

Tabela 4
Número de neutrófilos por campo, no cólon sigmóide, conforme o grupo estudado

<i>PMN/Campo</i> \ <i>Grupo</i>	<i>Sham</i>	<i>Choque</i>	<i>Pringle</i>	<i>Total</i>
Média	0,66	2,08	1,04	1,21
DP	0,44	1,11	0,71	1,03
N	8	8	7	7

ANOVA: $p = 0.021$ PMN – Polimorfonucleares

nutos de reperusão (RP60), ocorreu diferença estatisticamente significativa quanto aos valores relativos às contagens de neutrófilos por campo, nos diferentes grupos estudados ($p = 0.021$). Porém, na análise de comparação dois a dois, verifica-se que o grupo Choque apresentou diferença significativa apenas quando comparado ao Grupo Sham, não diferindo dos demais grupos, os quais, por sua vez, também, não diferiram entre si. Aqui, novamente, o grupo Sham foi o que apresentou menor contagem, porém, sem diferir dos grupos Pringle e Total.

Na análise de comparação dos diferentes grupos, isoladamente, considerando os valores relativos às contagens de neutrófilos no fêo terminal e no cólon sigmóide, constatou-se haver diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos (Sham, $p = 0.018$; Choque, $p = 0.005$; Pringle, $p = 0.031$; Total, $p = 0.017$), com predomínio destes valores no fêo terminal, em todos os grupos.

DISCUSSÃO

Na literatura, estudos mais recentes têm enfatizado os efeitos da isquemia e reperusão hepática na gênese da insuficiência de múltiplos órgãos, entre os quais destaca-se, principalmente, o intestino. Assim, em diversos modelos experimentais, a oclusão da tríade portal seguida por reperusão tem produzido lesão intestinal aguda caracterizada por danos nas células endoteliais capilares, pelo recrutamento e migração de neutrófilos da microcirculação para o interstício e conseqüente aumento da permeabilidade microvascular⁶⁻⁸.

Os neutrófilos recrutados na microcirculação parecem ter um importante papel na lesão típica de I/R intestinal que, de acordo com Conner *et al.*⁹, é o primeiro numa

série de eventos em “cascata”, secundários à hemorragia. Uma vez ativadas, estas células também são fontes potenciais de metabólitos reativos de oxigênio que, da mesma forma, agravam a lesão inicialmente provocada. Aqui, aderência dos neutrófilos ao endotélio vascular intestinal parece ser uma etapa essencial para esta ativação, processo este que potencializa a produção e a liberação de proteases e elastases, causando lesão adicional ao tecido. Deste modo, sendo um processo complexo, é importante notar que, embora seja relevante a participação dos neutrófilos, os mecanismos que induzem o seu recrutamento, ativação e a instalação da lesão tecidual ainda não estão totalmente esclarecidos^{6,10-12}.

Por outro lado, pode-se, de maneira bastante razoável, afirmar que uma futura terapia aplicada ao processo da I/R deverá considerar, inicialmente, a inibição da interação destas células com o endotélio vascular, de modo a diminuir, ou mesmo abolir, a conseqüente cadeia de eventos responsável pelo dano tecidual. Neste sentido, a contagem de PMN encontrado nos tecidos de diversos órgãos submetidos ao processo de I/R vem sendo utilizada como importante marcador para quantificar o grau de lesão associada. Assim, neste trabalho experimental, tentou-se estabelecer uma correlação entre a ocorrência de duas condições clínicas freqüentemente associadas — choque hemorrágico e isquemia hepática — e o acúmulo de neutrófilos no intestino de ratos.

Deste modo, diversos são os trabalhos que também abordam o assunto. Na literatura correlata, vários são os períodos de tempo testados para a isquemia e reperusão hepática, variando de poucos minutos a horas, nos casos de isquemia, ou, horas a dias, para reperusão, o que dificulta uma análise comparativa mais acurada. Desta for-

ma, sabe-se que a isquemia intestinal causada pelo pinçamento do pedículo hepático, mesmo que por tempo reduzido, impõe significantes prejuízos à microcirculação, traduzidos por diminuição do fluxo sanguíneo a órgãos distantes e pela interação neutrófilo/célula endotelial, que aumentam na fase de reperusão^{7,13-16}.

Portanto, neste modelo experimental de I/R hepática total, os resultados obtidos mostram que, entre os diferentes grupos analisados, ocorreu uma diferença estatisticamente significativa quanto ao acúmulo de neutrófilos no íleo terminal ($p < 0.001$) e, também, no cólon sigmóide ($p = 0.021$). Porém, em ambos os segmentos intestinais verificou-se que este acúmulo foi mais evidente no grupo de animais submetidos, unicamente, ao estado de choque hemorrágico controlado, ou seja, no grupo Choque, que, comparativamente, foi diferente dos outros grupos avaliados.

Considerando-se apenas o íleo terminal, verifica-se que, entre os diferentes grupos, os animais do grupo Choque diferiram estatisticamente dos demais, os quais não diferiam entre si. No cólon sigmóide, a análise estatística mostrou que o grupo Choque foi diferente apenas quando comparado ao grupo Sham. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas. Aqui, a concentração de neutrófilos encontrada no íleo terminal apresentou comportamento diferente quando comparada com aquela obtida no cólon sigmóide, evidenciando que, em todos os grupos estudados, os maiores valores do acúmulo de PMN ocorreram no íleo terminal, resultados estes verificados estatisticamente.

Curiosamente, diferente do que se poderia esperar, os animais do grupo Pringle e grupo Total, tanto no íleo terminal quanto no cólon sigmóide, apresentaram valores da contagem de neutrófilos muito semelhantes e pouco diferiram do grupo Sham, sugerindo que o pinçamento da tríade portal não foi o fator fundamental para o acúmulo dessas células nos tecidos intestinais destes animais, sendo os resultados confirmados pela análise estatística, que não mostrou diferença significativa entre os grupos nos quais a manobra para isquemia hepática foi realizada, apesar do pinçamento do ligamento hepato-duodenal causar congestão esplâncnica, igualmente, nos dois segmentos.

Esses resultados foram comparáveis com aqueles apresentados por Martins Jr.¹⁷ que, com um modelo experimental semelhante ao aqui empregado, mostrou, em ratos submetidos à isquemia hepática por 30 minutos, seguida de reperusão por períodos de 60 minutos, 120 minutos e 24 horas, não ter havido aumento no acúmulo de PMN no íleo terminal, ao contrário do que ocorreu no pulmão destes animais, sugerindo que existe uma “rota preferencial” dos neutrófilos para outros órgãos em detrimento do trato intestinal. Esta preferência pode ser explicada, segundo Fontes¹⁸, pela passagem inicial e maior captação dos PMN pelo leito vascular pulmonar, pela conseqüente inativação de receptores de neutrófilos existentes no endotélio vascular, ou mesmo pela maior ou menor afinidade destas células por determinados órgãos.

Resultados igualmente parecidos foram relatados por Simpson *et al.*¹⁹ que, utilizando modelo de I/R em ratos, relataram não ser fundamental a participação dos neutrófilos para o desenvolvimento de lesão intestinal e que outros mecanismos estão envolvidos, pois, com o emprego de ratos neutropênicos, estas lesões não são modificadas.

Assim, neste modelo adotado, o pinçamento do pedículo hepático, associado ou não ao estado de choque hemorrágico controlado, mostrou não ser a condição essencial para a migração e o acúmulo de neutrófilos nos tecidos dos segmentos intestinais, uma vez que nos grupos onde foi empregado os resultados pouco diferiram dos animais do grupo Sham. Por outro lado, nota-se também que, no presente experimento, a variável “choque hemorrágico”, diferentemente da manobra de Pringle, foi o fator fundamental para o desenvolvimento de lesão intestinal pós-isquemia/reperusão, pois, quando instalada de maneira isolada, foi suficiente para causar o seqüestro destes polimorfonucleares (PMN) para o interior dos tecidos.

De qualquer forma, neste trabalho, a manobra de Pringle representou um fator determinante para diminuir ou retardar o acúmulo de neutrófilos que poderia ser estimulado pelo estado de choque hemorrágico, como verificado nos animais do grupo Total. Neste sentido, algumas possíveis explicações podem ser sugeridas na tentativa de elucidar tal fato. Ou o represamento de sangue no leito vascular esplâncnico causado pelo pinçamento do pedículo hepático ou, ainda, a grande hemodiluição a que estes animais foram submetidos, poderiam ser as condições responsáveis por este resultado, sem, no entanto, desprezar o fator tempo de I/R hepática.

No primeiro caso, o acúmulo sanguíneo esplâncnico levaria ao retardamento do tempo de reperusão e, também, da migração de PMN para os tecidos intestinais.

Quanto ao fator hemodiluição, neste trabalho, verificou-se que os animais do grupo Pringle e Total foram aqueles que necessitaram de maior quantidade de infusão de líquidos para manter os valores da PAM dentro dos parâmetros estipulados pelo protocolo adotado, principalmente durante a fase de isquemia hepática. Esta infusão maciça de líquidos levou a uma hemodiluição, com baixos valores do hematócrito, que repercutiu durante a fase de reperusão, o que poderia diminuir o aporte de PMN aos tecidos intestinais.

Por outro lado, Deb *et al.*²⁰ demonstraram que, em ratos submetidos à hemorragia, a apoptose de células da mucosa intestinal, ao contrário do acúmulo de PMN, é um evento precoce e ocorre dentro da primeira hora de reperusão, variando, também, com o tipo de solução utilizada na reanimação. Estes autores afirmaram, ainda, ser o Ringer lactato a solução salina que mais induz a este tipo de lesão celular, embora, no estudo de Healey *et al.*²¹ esta seja a solução mais eficaz para reanimação nos casos de hemorragias maciças.

De qualquer forma, as três condições encontram-se diretamente interrelacionadas e interagindo para que tais resultados possam ser parcialmente explicados.

Assim, do presente estudo experimental pode-se concluir que: (a) a isquemia hepática por 15 minutos, associada ou não ao estado de choque hemorrágico, não foi a condição essencial para a migração e acúmulo de neutrófilos nos tecidos dos segmentos intestinais estudados; (b) o estado de choque hemorrágico foi o principal fator indutor do acúmulo de neutrófilos no íleo ter-

minal e cólon sigmóide pois, no grupo submetido, unicamente, a este tipo de agressão (grupo Choque), as contagens apresentaram valores mais elevados diferindo, significativamente, dos demais grupos estudados; (c) as contagens do acúmulo de neutrófilos no íleo terminal mostraram-se superiores às do cólon sigmóide em todos os grupos estudados.

ABSTRACT

Background: The purpose of this experimental work was to study the effects of total hepatic ischemia and reperfusion on the accumulation of neutrophils in the terminal ileum and sigmoid colon of rats, under normal conditions and under controlled hemorrhagic shock. **Method:** Thirty two adult male Wistar rats, were divided into four groups: Sham group, was submitted to standard procedures for a period of 60 min. of observation; Shock group, was submitted to controlled hemorrhagic shock (mean arterial blood pressure = 40mmHg, 20 min.) followed by fluid resuscitation (lactated Ringer's solution + blood, 3:1) and reperfusion for 60 min.; Pringle group, was submitted to total hepatic ischemia for 15 min. and reperfusion for 60 min.; Total group, was submitted to controlled hemorrhagic shock for 15 min. followed by volemic resuscitation (lactated Ringer's solution + blood, 3:1) and reperfusion for 60 min. Neutrophils counting on intestinal tissues was performed after euthanasia. **Results:** Values for neutrophils counting on the distal ileum indicate that, only animals from Shock group differed from other groups ($p < 0.001$) (Sham 1.33 ± 0.55 , Shock 5.48 ± 2.65 , Pringle 2.47 ± 1.38 , Total 2.44 ± 0.56). On sigmoid colon, Shock group differed only from Sham group ($p = 0.021$) and did not differ from other groups (Sham 0.66 ± 0.44 , Shock 2.08 ± 1.11 , Pringle 1.04 ± 0.71 , Total 1.21 ± 1.03). **Conclusions:** Differently from hemorrhagic shock, total hepatic ischemia for 15 minutes, followed by 60 minutes of reperfusion, did not present significant neutrophils accumulation on distal ileum and sigmoid colon tissues.

Key Words: Ischemia; Reperfusion; Hypovolemic shock; Pringle's maneuver; Neutrophil.

REFERÊNCIAS

- Cirocchi R, Contine A, Mazieri M et al. Il packing periepatico associato a wrapping nel trattamento dei grandi traumi epatici bilobari. *Chir Ital* 1999; 51:259-64.
- Poggetti RS, Moore FA, Moore EE et al. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg* 1992; 127:175-9.
- Wang X, Parsson H, Soltész V, et al. Bacterial translocation and intestinal capillary permeability following major liver resection in the rat. *J Surg Res* 1995; 58:351-8.
- Turnage RH, Kedesky KM, Myers SI et al. Hepatic hypoperfusion after intestinal reperfusion. *Surgery* 1996; 119:151-60.
- Lo CC, Chen JC, Chen HM et al. Aminoguanidine attenuates hemodynamic and microcirculatory derangement in rat intestinal ischemia and reperfusion. *J Trauma* 1999; 47:1108-13.
- Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA et al. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an in vitro model. *J Surg Res* 2000; 88:160-4.
- Man K, Fan ST, Ng IO et al. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997; 226:704-13.
- Beuk RJ, Heineman E, Tangelder GJ et al. Total warm ischemia and reperfusion impairs flow in all rat gut layers but increases leukocyte-vessel wall interactions in the submucosa only. *Ann Surg* 2000; 231:96-104.
- Conner WC, Gallagher CM, Miner TJ et al. Neutrophil priming state predicts capillary leak after gut ischemia in rat. *J Surg Res* 1999; 84:24-30.
- Rhee P, Burris D, Kaufmann C et al. Lactated Ringer's solution resuscitation causes neutrophil activation after hemorrhagic shock. *J Trauma* 1998; 44:313-9.
- Zallen G, Moore EE, Johnson JL et al. Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. *J Trauma* 1999; 46:42-8.
- Ward DT, Lawson AS, Gallagher CM et al. Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2000; 89:13-9.
- Gonce ME, Brackett DJ, Squires RA et al. Development of circulatory and metabolic shock following transient portal triad occlusion. *J Surg Res* 1995; 59:534-43.
- Beuk RJ, Heineman E, Tangelder J et al. Effects of different duration of total warm ischemia of the gut on rat mesenteric microcirculation. *J Surg Res* 1997; 73:14-23.
- Man K, Fan ST, Ng, IO et al. Tolerance of the liver to intermittent Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors. *Arch Surg* 1999; 134:533-9.
- Poggetti RS, Souza JR AL, Fontes B. "Isquemia e reperusão". In Younes RN, Birolini D (eds) — Bases fisiopatológicas da cirurgia. São Paulo. Lemar, 1999. pp. 135-51.

17. Martins Jr. O. Efeitos da isquemia e reperusão hepática total no seqüestro de neutrófilos no pulmão, rim e íleo terminal e na produção de citocinas. — Estudo experimental em ratos. Tese (Doutorado em Medicina). São Paulo. Universidade de São Paulo, 1997.
18. Fontes B. Isquemia/reperusão intestinal — Seqüestro pulmonar e hepático do neutrófilo ativado. Tese (Livre-Docência em Medicina). São Paulo. Universidade de São Paulo, 1992.
19. Simpson R, Alon R, Kobzik L et al. Neutrophil and non-neutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218:444-54.
20. Deb S, Martin B, Sun L et al. Resuscitation with lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis. *J Trauma* 1999; 46:582-9.
21. Healey MA, Davis RE, Liu FC et al. Lactated Ringer's is superior to normal saline in a model of massive hemorrhage and resuscitation. *J Trauma* 1998; 45: 894-9.

Endereço para correspondência:
Mauro Fontelles
Rua Major Solon, 615/62 — Cambuí
13024-907 — Campinas-SP
e-mail: mikefox@uol.com.br