NILON ERLING JUNIOR

Disfunção endotelial na microcirculação mesentérica causada pela isquemia e reperfusão no pinçamento aórtico supracelíaco e o efeito protetor do precondicionamento isquêmico local e remoto

Tese apresentada à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

NILON ERLING JUNIOR

Disfunção endotelial na microcirculação mesentérica causada pela isquemia e reperfusão no pinçamento aórtico supracelíaco e o efeito protetor do precondicionamento isquêmico local e remoto

Tese apresentada à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, pelo programa de pósgraduação em Cirurgia Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo

SÃO PAULO

2010

Erling Junior, Nilon

Disfunção endotelial na microcirculação mesentérica causada pela isquemia e reperfusão no pinçamento aórtico supracelíaco e o efeito protetor do precondicionamento isquêmico local e remoto. / Nilon Erling Junior -- São Paulo, 2010.

xv, 116f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Cardiovascular.

Título em inglês: Endothelial dysfunction on mesentery microcirculation caused by ischemia and reperfusion injury of supraceliac aortic clamping and the protective effect of local remote ischemic preconditioning.

1. Isquemia. 2. Reperfusão. 3. Precondicionamento isquêmico. 4. Aneurisma aórtico. 5. Microcirculação. 6. Endotélio vascular. 7. Moléculas de adesão celular.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA CARDIOVASCULAR

Chefe do Departamento:
Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira
Coordenador do Curso de Pós-Graduação:
rof. Dr. Fausto de Miranda Junior

NILON ERLING JUNIOR

Disfunção endotelial na microcirculação mesentérica causada pela isquemia e reperfusão no pinçamento aórtico supracelíaco e o efeito protetor do precondicionamento isquêmico local e remoto

Presidente da banca

Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista da Silva

Professor Associado Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Airton Delduque Frankini

Professor Adjunto Doutor da Disciplina de Angiologia e Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato

Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Vascular e Endovascular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Newton de Barros Júnior

Professor Adjunto Doutor da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Paulina Sannomiya

Pesquisadora Livre Docente da Unidade Cirúrgica de Pesquisa do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo

Membros Suplentes

Prof. Dr. Fausto Miranda Junior

Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida

Professor Adjunto Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa JULIANA ECHEL, que me traz naturalmente a felicidade todos os dias nas pequenas coisas da vida. Agradeço o apoio constante aos meus anseios e compreensão sobre a interminável busca de conhecimento.

Aos meus queridos pais, NILON ERLING e JOANA CAFRUNI ERLING. Pelo amor incondicional e exemplo. Sou grato por tudo o que fazem pela formação de seus filhos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Poli De Figueiredo, pela orientação desta tese desde sua concepção, amizade e convívio sempre enriquecedor. Com sua extraordinária capacidade de trabalho, fortemente influenciou minha percepção e poscionamente científico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista da Silva, pela disponibilidade e gentileza em orientar esta tese.

À Profa. Dra. Paulina Sannomiya, por sua grandeza e generosidade científica, grande responsável por viabilizar a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero, pelo enfrentamento conjunto das dificuldades da realização de pesquisa experimental.

Ao Prof. Dr. Fausto de Miranda Junior, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Vascular e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Cardiovascular da UNIFESP, pelo acolhimento e compreensão.

Ao Prof. Dr. Airton Delduque Frankini, por me aproximar de pessoas capazes de transformar idéias em realizações.

À Dra. Naomi Kondo Nakagawa, pela participação na aquisição dos dados de microscopia intravital.

Ao Dr. José Walber Miranda Costa Cruz, pela participação na aquisição dos dados imuno-histoquímicos.

Ao Prof. Dr. Manoel de Jesus Simões, pela participação na aquisição dos dados histopatológicos.

Ao Dr. Fernando Luiz Zanoni, pela disponibilidade em somar esforços no laboratório.

À Profa. Luisa Jussara Coelho, pela cuidadosa análise estatística.

A minha irmã Carmen Erling Forte e meu cunhado Rafael de Castro Forte, pela paciência nos horários mais impróprios.

À Disciplina de Cirurgia Vascular desta casa, em todos seus docentes e colaboradores, por me sentir, também aqui, em casa.

A todos os colegas pesquisadores e colaboradores do LIM-11, pelo convívio agradável no ambiente de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro à realização deste projeto (processo: 04/15964-6).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a concessão de bolsa de pós-graduação de doutorado pelo programa de demanda social (DS).

SUMÁRIO

Dedicatoria	V		
Agradecimentos			
ista de figuras			
Lista de abreviaturas	xiii		
esumo			
. INTRODUÇÃO			
2. OBJETIVOS			
3. MATERIAL E MÉTODOS 1			
3.1 Animais de experimentação	16		
3.2 Modelo experimental	16		
3.2.1 Pré-operatório	16		
3.2.2 Anestesia	17		
3.2.3 Preparação cirúrgica	17		
3.3 Protocolo experimental e grupos de estudo	20		
3.4 Variáveis analisadas	21		
3.4.1 Análise hemodinâmica – pressão arterial média	21		
3.4.2 Análise laboratorial	21		
3.4.3 Análise <i>in-vivo</i> da microcirculação – microscopia intravital	22		
3.4.4 Análise imuno-histoquímica	22		
3.4.5 Análise histopatológica	24		
3.5 Metodologia estatística	24		
4. RESULTADOS	26		
4.1 Peso dos animais	27		
4.2 Pressão arterial média	28		
4.3 Variáveis laboratoriais	33		
4.3.1 Gasometria arterial	33		
4.3.2 Potássio arterial	39		
4.3.3 Lactato arterial	40		
4.3.4 Desidrogenase lática	41		
4.3.5 Hematócrito	42		
4.3.6 Leucograma	43		

4.4 Microscopia intravital	49		
4.4.1 Diâmetro dos vasos	50		
4.4.2 Leucócitos em rolamento	51		
4.4.3 Velocidade de rolamento dos leucócitos	52		
4.4.4 Leucócitos aderidos	53		
4.4.5 Leucócitos migrados	54		
4.5 Imuno-histoquímica	55		
4.5.1 P-selectina	55		
4.5.2 E-selectina	56		
4.5.3 ICAM-1	58		
4.6 Histopatologia intestinal			
4.6.1 Espessura total da mucosa	61		
4.6.2 Altura da vilosidade	62		
4.6.3 Profundidade da cripta	63		
4.6.4 Relação altura da vilosidade / profundidade da cripta	64		
4.7 Mortalidade do experimento	65		
5. DISCUSSÃO	66		
6. CONCLUSÕES	82		
7 ANEXOS	84		
8. REFERÊNCIAS			
Abstract			

Apêndices

Bibliografia consultada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Formação do radical livre superóxido e a relação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na lesão de I/R	5
Figura 2:	Ilustração simplificada das diversas etapas do recrutamento leucocitário no endotélio de uma vênula pós-capilar, com as principais moléculas de adesão envolvidas neste processo	7
Figura 3:	Proteção bifásica induzida por um episódio de precondicionamento isquêmico	11
Figura 4:	Preparo da via aérea. Cervicotomia e dissecção da traquéia (A). Traqueostomia e inserção de cateter intravascular modificado (B)	17
Figura 5:	Acessos vasculares observados através de lupa com magnificação de 10x. Arteriotomia da carótida interna (A) para inserção de cateter de polietileno (B). Dissecção da veia jugular externa (C) e inserção de cateter de polietileno(D). Aspecto final dos cateteres intravasculares fixados (E)	18
Figura 6:	Dissecção da aorta abdominal supracelíaca (A). Reparo com fio de algodão 0 (B) para a confecção de torniquete de Rumel (C)	18
Figura 7:	Dissecção da aorta abdominal infrarrenal (A). Reparo com fio de algodão 0 (B) para a confecção de torniquete de Rumel (C)	19
Figura 8:	Posicionamento dos animais durante o experimento sobre placa metálica aquecida (A). Cateteres intra-arteriais foram conectados a transdutores (A – seta) para aquisição das medidas da pressão arterial em programa de computador específico (B)	19
Figura 9:	Protocolo experimental	20
Figura 10:	Posicionamento do animal sobre placa acrílica aquecida (A), com exposição do mesentério para observação microscópica intravital (B)	20
Figura 12:	Peso dos animais (g)	26
Figura 13:	Variação da PAM (mm Hg) no grupo controle	27
Figura 14:	Variação da PAM (mm Hg) no grupo I-R	28
Figura 14:	Variação da PAM (mm Hg) no grupo PCI-L	29
Figura 15:	Variação da PAM (mm Hg) no grupo PCI-R	30
Figura 16:	Variação da PAM (mm Hg) nos grupos	31
Figura 17:	Variação do pH arterial	32
Figura 18:	Variação do EB arterial (mEq/L)	33
Figura 19:	Variação do pCO ₂ arterial (mm Hg)	34
Figura 20:	Variação da concentração de HCO₃ arterial (mEq/L)	35
Figura 21:	Variação do pO ₂ arterial (mm Hg)	36

Figura 22:	Variação da saturação de O ₂ arterial (%)	37
Figura 23:	Variação da concentração de potássio arterial (mEq/L)	38
Figura 24:	Variação da concentração de lactato arterial (mmol/L)	39
Figura 25:	Concentração sérica de DHL arterial (UI/L)	40
Figura 26:	Variação do hematócrito (%)	41
Figura 27:	Variação da contagem total de leucócitos	42
Figura 28:	Variação da contagem de neutrófilos. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm3)	43
Figura 29:	Variação da contagem de monócitos. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm³)	44
Figura 30:	Variação da contagem de linfócitos. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm³)	46
Figura 31:	Variação da contagem de eosinófilos. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm³)	47
Figura 32:	Fotomicrografia <i>in-vivo</i> da microcirculação mesentérica	48
Figura 33:	Diâmetro venular (A) e arteriolar (B)	49
Figura 34:	Número de leucócitos em rolamento	50
Figura 35:	Velocidade de rolamento leucocitário	51
Figura 36:	Número de leucócitos aderidos	52
Figura 37:	Número de leucócitos migrados	53
Figura 38:	Expressão de P-selectina	54
Figura 39:	Fotomicrografia do mesentério mostrando detecção de P-selectina por imunofluorescência	55
Figura 40:	Expressão de E-selectina	56
Figura 41:	Fotomicrografia do mesentério mostrando detecção de E-selectina por imunofluorescência	56
Figura 42:	Expressão de ICAM-1 por grupo	57
Figura 43:	Fotomicrografia do mesentério mostrando detecção de ICAM-1-selectina por imunofluorescência	58
Figura 44:	Fotomicrografia do intestino delgado	59
Figura 45:	Espessura total da mucosa (μm)	60
Figura 46:	Altura da vilosidade (µm)	61
Figura 47:	Profundidade da cripta (μm)	62
Figura 48:	Relação altura da vilosidade / profundidade da cripta (um)	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA aneurisma de aorta abdominal

AATA aneurisma de aorta toracoabdominal

ACTP angioplastia coronariana transluminal percutânea

AMS artéria mesentérica superior

ATP adenosina trifosfato

°C grau Celsius

CD cluster of differentiation
CEC circulação extracorpórea

cel/mm³ células por milímetro cúbico

cm Centímetro

CRM cirurgia de revascularização miocárdica

DHL desidrogenase lática

EB excesso de base

ELAM endothelial-leukocyte adhesion molecule

EP erro padrão

ESGL *E-selectin glycoprotein ligand*EVAR *endovascular aneurysm repair*

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

g Grama

GlyCAM glycosylation-dependent cell adhesion molecule

GMP-140 granule membrane protein-140

HCFMUSP Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

I/R isquemia e reperfusão

ICAM intercellular adhesion molecule

IL Interleucina

I-R grupo experimental isquemia e reperfusão

JAM juncional adhesion molecules

kg Quilograma

LAM leukocyte adhesion molecule

LECAM leukocyte-endothelial cell adhesion molecule

LFA lymphocyte function-associated antigen

LIM-11 Laboratório de Experimentação Médica 11

Mac macrophage antigen

MAdCAM mucosal-vascular-addressin cell adhesion molecule

μm Micrômetro

μm/s micrômetro por segundo μm² micrômetro quadrado

mEq/L miliequivalente-grama por litro

mg Miligrama ml Mililitro

mm Hg milímetro de mercúrio

mmol/L milimol por litro

NOS óxido nítrico sintetase

PADGEM platelet-activation-dependent granule external membrane protein

PAM pressão arterial média

PBS phosphate buffered saline

PCI precondicionamento isquêmico

PCI-L grupo experimental precondicionamento local

PCI-R grupo experimental precondicionamento remoto

pCO₂ pressão parcial de dioxide de carbono

PECAM platelet-endothelial adhesion molecule

pO₂ pressão parcial de oxigênio

PSGL P-selectin glycoprotein ligand

RNS reactive nitrogen species - espécies reativas de nitrogênio

ROS reactive oxigen species - espécies reativas de oxigênio

sL^x grupo sialil Lewis^x

SOD superóxido desmutase

SWOP second window of protection

t(40) tempo (40) do experimento – (40) minutos de experimento

TNF- α fator de necrose tumoral alfa

UI unidade internacional

UI/L unidade internacional por litro

UNIFESP/EPM Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina

VCAM vascular cell adhesion molecule

RESUMO

Erling Jr, N. Disfunção endotelial na microcirculação mesentérica causada pela isquemia e reperfusão no pinçamento aórtico supracelíaco e o efeito protetor do precondicionamento isquêmico local e remoto [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo; 2010. 116p.

INTRODUÇÃO: O pincamento da aorta supracelíaca em procedimentos vasculares maiores desencadeia uma lesão de isquemia e reperfusão (I/R) esplâncnica que pode induzir uma disfunção endotelial, inflamação generalizada, disfunção de múltiplos órgãos e óbito. OBJETIVOS: Testar a hipótese que o precondicionamento isquêmico (PCI) local ou remoto tenha efeito protetor contra a lesão de I/R causada pelo pinçamento aórtico supracelíaco através da modulação das interações leucócito-endotélio, avaliadas pela microscopia intravital e expressão de moléculas de adesão, e também analisar as variações hemodinâmicas, laboratoriais e histopatológicas intestinais relacionadas a estas intervenções. MATERIAL E MÉTODOS: Cinquenta e seis ratos machos da linhagem Wistar EPM-1, pesando 190 a 250 g foram divididos em 4 grupos: Controle: (n=14) cirurgia simulada sem pinçamento aórtico; I-R: (n=14) pinçamento aórtico supracelíaco por 20 minutos, seguido de 120 minutos de reperfusão; PCI-L: (n=14) PCI local através do pinçamento supracelíaco com dois ciclos de 5 minutos de isquemia e 5 minutos de reperfusão, seguido do mesmo protocolo do grupo I-R. PCI-R: (n=14) PCI remoto através do pinçamento infrarrenal com dois ciclos de 10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão, seguido do mesmo protocolo do grupo I-R. Sete animais por grupo foram utilizados para a avaliação in-vivo das interações leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares por meio de microscopia intravital. Outros sete animais por grupo foram utilizados para coleta de mesentério para a avaliação imuno-histoquímica da expressão de moléculas de adesão, e demais coletas de tecidos utilizados neste estudo. RESULTADOS: O pinçamento supracelíaco aumentou o número de leucócitos em rolamento e diminuiu a velocidade de rolamento leucocitário, aumentou o número de leucócitos aderidos ao endotélio e migrados para o interstício. A expressão de P-selectina, E-selectina e ICAM-1 aumentou neste grupo. O PCI local ou remoto reduziu o recrutamento leucocitário in-vivo, e normalizou a expressão das moléculas de adesão. O pinçamento supracelíaco também causou alterações intensas em variáveis laboratoriais e uma lesão intestinal grave com perda de altura das vilosidades e profundidade das criptas. O PCI local ou remoto atenuou as alterações laboratoriais, e reduziu a intensidade da lesão intestinal. CONCLUSÕES: O PCI local ou remoto reduz a disfunção endotelial na microcirculação mesentérica causada pela lesão de I/R no pinçamento aórtico supracelíaco, e minimiza a agressão tecidual à mucosa intestinal.



1. INTRODUÇÃO

A doença aneurismática da aorta é uma situação clínica comum e importante causa de óbito após os 55 anos de idade.^{1, 2} Dados populacionais apontam para um aumento proporcional na mortalidade causado pela ruptura de aneurismas aórticos nas últimas décadas.³ Mesmo com inúmeros avanços operatórios, anestésicos e de cuidados intensivos pós-operatórios, não se evidencia uma queda significativa da mortalidade no reparo cirúrgico do aneurisma de aorta abdominal (AAA) roto neste período, mantendo-se próximo a 50%.⁴

Ainda se considerarmos o reparo eletivo do AAA, existe uma mortalidade considerável relacionada ao procedimento. São relatadas taxas de mortalidade bastante variáveis para esta situação, influenciada principalmente pelo delineamento dos estudos, baseados em dados hospitalares ou populacionais, prospectivos ou retrospectivos.^{5, 6} Em centros de excelência, a mortalidade varia de 1 a 4%,⁷⁻⁹ mas análises mais amplas, de bancos de dados de abrangências nacionais, mostram mortalidade entre 4 a 8%.¹⁰⁻¹⁴

Um grande progresso no tratamento desta doença foi a possibilidade da exclusão endoluminal do aneurisma. Alguns estudos mostraram que este reparo endovascular (EVAR – endovascular aneurysm repair) diminuiu a morbidade e mortalidade imediata em situações eletivas. ¹⁵⁻²⁰ Esta técnica, que inicialmente era indicada para pacientes com condições clínicas adversas para a operação aberta, ²¹ tem hoje se tornado uma opção cirúrgica preferencial. ^{22, 23}

No entanto, este método pode ser empregado apenas em pacientes com configuração anatômica favorável para o implante da endoprótese.²⁴ Estima-se que mais de 40% dos pacientes com aneurismas aórticos não conseguem ser elegíveis para esta intervenção.²⁵ Embora alguns autores tenham inicialmente descrito um aumento no número total de casos de AAA tratados com o advento do reparo endovascular,²⁶ se reconhece uma forte tendência na diminuição de cirurgias abertas para correção de AAA infrarrenais de anatomia mais simples, com impacto inclusive no treinamento de cirurgiões em formação.²⁷⁻²⁹ Outra observação neste

contexto foi um aumento proporcional nos casos complexos que envolvem as artérias viscerais tratados com cirurgia convencional e necessitando pinçamento aórtico suprarrenal. 30, 31

Doenças da aorta envolvendo as artérias viscerais como é o caso dos aneurismas toracoabdominais (AATA) representam desafios ainda maiores a uma equipe de cirurgia vascular. A técnica de pinçamento aórtico e reconstrução direta com oclusão temporária do fluxo sangüíneo visceral e dos membros inferiores durante todos os tempos cirúrgicos ("clampand-sew" ou "clamp and go")^{32, 33} foi acrescida de técnicas adjuntas como perfusão distal aórtica e visceral seletiva, drenagem liquorica e resfriamento epidural.³⁴⁻⁴⁰ Embora séries atuais mostrem que estas técnicas melhoraram os resultados da correção dos AATA, ainda existe uma morbidade elevada por complicações pulmonares e cardíacas, além da insuficiência renal e paraplegia. Em centros de grande experiência dedicados a esta doença, as taxas de mortalidade do procedimento em 30 dias encontram-se entre 5 e 8,5%.^{41, 42} No entanto, dados de registros populacionais mostram que estes resultados não conseguem ser totalmente reprodutíveis, com mortalidade em 30 dias variando de 19 a 22,3%.^{43, 44}

Assim, grandes esforços são necessários para minimizar os danos viscerais e musculares causado pelo pinçamento da aorta supracelíaca. A oclusão temporária da aorta neste nível submete extensos territórios à isquemia, que é definida como um fluxo arterial insuficiente para manter as funções teciduais normais, com a diminuição do aporte de nutrientes e oxigênio e acúmulo de produtos do metabolismo celular. O restabelecimento de adequado fluxo sanguíneo após as reconstruções vasculares, embora fundamental para restaurar a viabilidade celular, também causa lesões que podem tornar ainda maior o dano inicial. O conjunto de lesões causadas pela reperfusão de tecidos isquêmicos é descrito como lesão de isquemia e reperfusão (I/R).

O processo de lesão de I/R inicia-se durante a isquemia, com o desbalanço metabólico celular causado principalmente pela oferta reduzida de oxigênio, mas também pelo acúmulo de produtos do metabolismo celular e pela acidose. A falta de oxigênio estimula a produção anaeróbica de adenosina trifostato (ATP) pela via glicolítica, que é menos efetiva que a respiração mitocondrial. Com a progressão deste processo e acúmulo de citrato e lactato, esta via é também inibida pela acidose tecidual que se estabelece. Com a hipóxia persistente, as reservas de energia podem cair a um ponto insuficiente para manter a homeostasia celular,

causando a falência da bomba Na⁺/K⁺-ATPase e conseqüente aumento do Na⁺ intracelular, edema e eventual ruptura celular. A diminuição de ATP também resulta em falência de outros canais iônicos dependentes de ATP, que causam alterações na concentração intracelular de outros íons, como o Ca²⁺, que se acumula no citoplasma e pode inapropriadamente ativar enzimas degradativas como lípases e protease. O aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular causa também lesão mitocondrial, levando a abertura do poro de permeabilidade mitocondrial, que desfaz o gradiente eletroquímico necessário à síntese de ATP, além de ativar e liberar para o citoplasma caspases indutoras de apoptose.⁴⁷⁻⁴⁹

Nos tecidos previamente expostos à isquemia, existe uma susceptibilidade aumentada ao estresse oxidativo no período da reperfusão. Apesar de essencial para o restabelecimento da fosforilação oxidativa, a reoxigenação leva a geração em excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species), além da capacidade celular normal de depurá-las. A formação de ROS, que normalmente ocorre no sistema de transporte de elétrons mitocondrial, por exemplo, é aumentada em diversas rotas metabólicas, em especial de forma enzimática pela xantina oxidase. Durante a isquemia, ocorre o acúmulo de hipoxantina pela degradação do ATP, e a conversão da enzima xantina desidrogenase em sua forma oxidativa. Após a reperfusão, esta enzima, a xantina oxidase, oxida a hipoxantina em xantina e depois em urato, levando à formação de moléculas do radical livre superóxido ($O_2^{\bullet-}$)⁵⁰ (figura 1).

No entanto, o radical livre superoxido não é uma molécula particularmente reativa a compostos orgânicos. Em presença de diferentes izoenzimas superoxido desmutase (SOD) ele pode ser transformado em peroxido de hidrogênio (H₂O₂), uma molécula oxidante também considerada não tão potente. A geração em excesso de H₂O₂ pode dar origem ao radical livre hidroxila (OH•-) pela reação de Fenton-Haber-Weis tendo o íon ferroso como catalisador. O radical hidroxila é o mais tóxico ROS, rapidamente reagindo com a maioria dos compostos orgânicos. ⁵¹

Embora os ROS sejam citados como importantes oxidantes, a reatividade limitada do superóxido origina algumas controvérsias sobre a sua real toxicidade celular na lesão de I/R. A preposição da lesão dos ROS ser causada diretamente pelo oxidante mais potente hidroxila também é questionada devido à necessidade de íons quelantes para sua formação em reações lentas. Outro ponto de dúvida é sua quase incapacidade de difusão por ser extremamente

reativo a qualquer substrato orgânico, tornando sua toxicidade limitada muitas vezes a moléculas com menor importância biológica. 52, 53

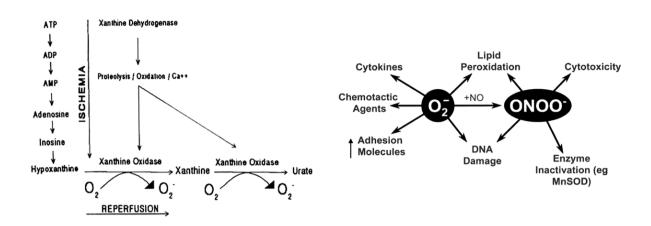


Figura 1: Formação do radical livre superóxido e a relação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na lesão de I/R. Adptado de Cuzzocrea S, et al. 52

Neste contexto, espécies reativas de nitrogênio (RNS – reactive nitrogen species) derivadas das reações entre o oxigênio e o nitrogênio, são reconhecidas como importantes mediadores na lesão de I/R. O óxido nítrico (NO) é produzido em circunstâncias fisiológicas pelas óxido nítrico sintases (NOS) neuronal (nNOS ou NOS1) e endotelial (eNOS ou NOS3) em quantidades controladas, tendo múltiplas funções na sinalização celular. Na homeostasia vascular, o NO possui um papel regulador com efeitos vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária e da proliferação de células musculares lisas e regulador das interações entre leucócitos e a parede vascular. Já estímulos inflamatórios ativam outra NOS, a induzida (iNOS ou NOS2), que produz de forma mais persistente maiores quantidades de óxido nítrico, sendo responsável pelos efeitos deletérios deste radical na microcirculação. 54,55

Mas a importância patológica do NO no processo de I-R não ocorre apenas pela sua maior produção continuada. Hoje se reconhece que muito dos efeitos deletérios dos RNS são decorrentes de outro radical, o peroxidonitrito (ONOO $^-$) (figura 1). Esta molécula, originada em uma reação espontânea e imediata do NO com o $O_2^{\bullet-}$, é um potente oxidante e surpreendentemente estável. Sua reatividade limitada com a maioria das moléculas o torna um

oxidante mais seletivo, aumentando sua influência sobre processos biológicos de maior relevância.⁵³

Mas explicações muito simplificadas sobre o papel das diversas substâncias envolvidas na lesão de I/R, não conseguem levar ao entendimento de processos bioquímicos tão complexos e aparentemente até paradoxais, não sendo o foco do presente estudo.

Com a geração de ROS e RNS, a lesão de I/R é amplificada pela liberação de diversos mediadores inflamatórios e modificação do comportamento leucocitário no endotélio. Esta situação é basicamente mediada por neutrófilos, em uma cascata de eventos com propriedades semelhantes a uma reação inflamatória aguda. O recrutamento leucocitário aumenta ainda mais o potencial oxidante nos tecidos reperfundidos, levando a uma disfunção microvascular progressiva. ⁵⁶ E esta é uma das principais características da lesão de I/R e fator central na amplificação da resposta inflamatória sistêmica e falência de múltiplos órgãos, ⁵⁷ responsável pelo excesso de mortalidade dos pacientes críticos no pós-operatório da correção dos AATA. ⁵⁸,

Diferentes tipos celulares possuem tolerâncias variadas à lesão de I/R. As células endoteliais são particularmente sensíveis a este estímulo. Embora a exposição à lesão de I/R seja semelhante em toda a microcirculação, a disfunção endotelial resultante se manifesta diferentemente nas arteríolas, capilares e vênulas.⁶⁰

A disfunção endotelial nas arteríolas se manifesta basicamente pela menor capacidade de relaxamento da musculatura lisa mediada pelo NO derivado do endotélio. ⁶¹ Já nos capilares a lesão de I/R é caracterizada por uma diminuição do número de vasos perfundidos e aumento de permeabilidade com extravasamento de fluido para o interstício. Embora agregados de plaquetas e leucócitos possam ser responsáveis pela oclusão de capilares, o aumento da condutividade hidráulica e extravasamento de macromoléculas, causando edema intersticial e compressão destes vasos, parecem ser os principais responsáveis pela perfusão capilar reduzida. ⁶² O conjunto destas alterações de não reperfusão adequada após o restabelecimento de fluxo sangüíneo tecidual (*"no-reflow phenomenon"*) foi identificado em diversos tecidos, ^{63, 64} e é reconhecido como preditor de pior prognóstico após intervenções coronárias no infarto agudo do miocárdio, por exemplo. ⁶⁵

Mas é nas vênulas pós-capilares que a reação inflamatória associada à lesão de I/R ganha maior importância. A resposta deste território à lesão de I/R é também um aumento da permeabilidade vascular, fortemente envolvido na formação do edema tecidual e depleção de volume intravascular. 66 Mas aqui se destaca a acentuada interação entre os leucócitos e as células endoteliais, responsável pelo recrutamento, basicamente, de neutrófilos. 67

As interações leucócito-endotélio são processos complexos que envolvem múltiplas etapas. Refinamento nas técnicas de videomicroscopia intravital permitiram a avaliação qualitativa e quantitativa destas interações em diversos leitos microvasculares. ⁶⁸ Um dos locais mais utilizados para esta observação é no mesentério, sendo empregado em nosso meio em diversos modelos de choque e inflamação. ^{69, 70}

O paradigma clássico do recrutamento inflamatório envolve o tráfego de leucócitos em áreas marginais na periferia do vaso que adquirem um comportamento de rolamento sobre o endotélio (*rollers*), em velocidades progressivamente mais lentas, até que se tornem aderidos a parede do vaso (*stikers*), para depois emigrarem para o tecido perivascular (*migrated*) (figura 2).⁷¹⁻⁷³

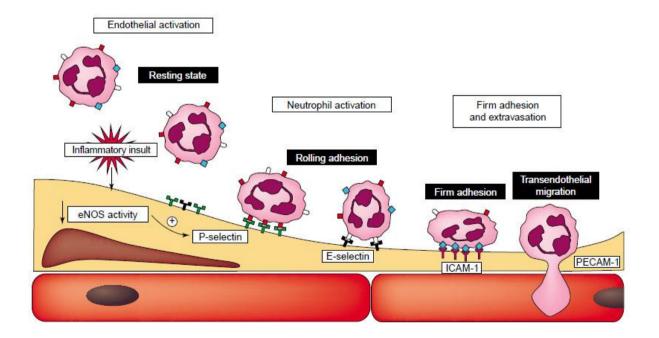


Figura2: Ilustração simplificada das diversas etapas do recrutamento leucocitário no endotélio de uma vênula pós-capilar, com as principais moléculas de adesão envolvidas neste processo. Adaptado de Kakkar AK e Lefer DJ.⁷⁴

Cada uma destas etapas é mediada por moléculas de adesão expressas na superfície celular. Estas moléculas pertencem às famílias das selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas.⁷⁵

As selectinas são as moléculas primariamente envolvidas com a etapa inicial do rolamento leucocitário e compreendem três moléculas relacionadas: P-selectina (CD62P, GMP-140, PADGEM, LECAM-3); E-Selectina (CD62E, ELAM-1, LECAM-2); e L-selectina (CD62L, LAM-1, LECAM-1).

A P-selectina é uma proteína originalmente purificada de plaquetas, sendo posteriormente encontrada em células endoteliais. Ela é constituitivamente expressa em grânulos secretórios no endotélio, chamados de corpúsculos de Weibel-Palade. Sob estímulos apropriados, estes corpúsculos fundem-se à membrana plasmática levando a expressão na superfície celular da P-selectina em poucos minutos. Assim, a P-selectina é frequentemente envolvida na mediação precoce do recrutamente leucocitário durante a resposta inflamatória.⁷⁹

A E-Selectina também é expressa por células endoteliais. Diferente da P-selectina, a E-selectina não é constituitivamente presente nestas células, sendo sua expressão regulada transcricionalmente por mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1).

A L-selectina é expressa na maioria dos leucócitos, e foi inicialmente identificada como receptor de alojamento linfocitário. A L-selectina é singular ao ser a única selectina mediando o recrutamento de linfócitos no tecido linfático. Alguns dados sugerem que a L-selectina tenha papel como mediador de recrutamento de neutrófilos em estágios mais tardios da resposta inflamatória.⁸¹

O desenvolvimento de animais geneticamente modificados, com ausências destas moléculas de adesão, ajudou no entendimendo de suas funções. Camundongos deficientes em

P-selectina exibiram menor intensidade de lesão em modelos de I/R,⁸² e recrutamento leucocitário lentificado em resposta a estímulos inflamatórios diretos.⁷⁹ Estudos em animais com diversas combinações de deficiências de selectinas confirmam um papel predominante da P-selectina no rolamento leucocitário, mas mostraram que animais duplamente deficientes em P- e E-selectina apresentam fenótipos muito mais alterados que qualquer bloqueio isolado.⁸³⁻⁸⁵

As selectinas possuem afinidade pelo grupo sialil Lewis^x (sL^x), e os principais receptores com atividade para a P-selectina e E-selectina são PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) e ESGL-1 (E-selectin glycoprotein ligand-1) respectivamente, ambas expressas em leucócitos. Para a L-selectina diversos ligantes foram identificados, como GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), CD34 (sialomucin), MAdCAM-1 (mucosal-vascular-adressin cell adhesion molecule-1) e a própria PSGL-1, embora o exato papel in vivo destas moléculas não seja bem estabelecido.⁷⁸

Seguindo-se a etapa inicial de rolamento sobre a superfície endotelial, os leucócitos podem tornar-se estacionários. Considera-se um leucócito aderido quando se encontra imóvel por mais de 30 segundos. Após um período de adesão estacionária, o leucócito pode deixar a vênula pós-capilar, migrando para o compartimento intersticial adjacente. O processo de emigração é dificilmente avaliado em tempo real por microscopia intravital, mas é quantificado pelo número de leucócitos no interstício perivenular. As moléculas de adesão envolvidas nesta etapa são as integrinas e as moléculas da superfamília das imunoglubulinas.

As integrinas são moléculas heterodiméricas compostas por duas subunidades, uma α e outra β , arranjadas em subfamílias conforme o tipo de subunidade β . Pares específicos $\alpha\beta$ estão presentes em diversos tipos celulares. Quatro das subunidades β são encontradas em leucócitos, sendo a β 2 e a β 7 expressas somente nestas células.⁷⁵

Com especial importância nas interações leucócito-endotélio, as moléculas pertencentes à subfamília $\beta 2$ (CD18) formam o complexo CD11/CD18, sendo distintas entre si pela presença das subunidades α : α L (CD11a), α M (CD11b), α X (CD11c) ou α D (CD11d). Em condições fisiológicas estas integrinas não se encontram ativas, e não promovem adesão de leucócitos ao endotélio. Após estímulos inflamatórios, moléculas como a CD11a/CD18 (LFA-1 - *lymphocyte function-associated antigen-1*) e a CD11b/CD18 (Mac-1 - *macrophage antigen-1*) tem sua afinidade aumentada por seus ligantes da superfície endotelial, aumentando a avidez

deste contato. 86 Estudos em animais tratados com anticorpos contra a fração β 2 do complexo CD11/CD18 mostraram adesão leucocitária reduzida em vênulas pós-capilares. $^{87, \, 88}$

O terceiro grupo de moléculas de adesão envolve moléculas com uma ou mais unidades homólogas à classe das imunoglobulinas G. Fazem parte deste grupo diversas moléculas como ICAM (intercellular adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule), PECAM (platelet-endothelial adhesion molecule) e JAM (juncional adhesion molecules). Algumas destas moléculas são os ligantes para as integrinas presentes nos leucócitos.

A subfamília ICAM (CD54) é composta por 5 membros: ICAM-1, -2, -3, -4 e -5. Estas moléculas encontram-se constituitivamente presentes em diversos tipos celulares, como células epitelias e fibroblastos. No endotélio, o ICAM-1 é o receptor de maior importância para a adesão leucocitária. Seus ligantes neste processo são os complexos CD11a/CD18 (LFA-1) e CD11b/CD18 (Mac-1), e sua expressão é regulada por transcrição gênica, estando aumentada após períodos de I/R e diversos outros estímulos inflamatórios. ^{89, 90} O bloqueio de ICAM-1 com anticorpos mostrou-se capaz de reduzir o infiltrado neutrofílico à distância após lesão de I/R causada pela oclusão da aorta infrarrenal. ⁹¹

A aderência dos leucócitos à superfície endotelial não é o processo final da ativação inflamatória. O próprio contato do neutrófilo com o célula endotelial é um estímulo para ativação de outras moléculas de adesão e também alterações estruturais para permitir a emigração dos leucócitos. ⁹² Umas das moléculas de adesão envolvidas neste processo é a PECAM-1 (CD31). Após estímulo inflamatório, existe um aumento de expressão desta molécula, mas também sua redistribuição na superfície endotelial, concentrando-se nas bordas das células onde participa da migração transendotelial. ⁹³ Estudos em animais com modelos de inflamação mostraram que o tratamento com anticorpos contra PECAM-1 bloqueia o extravasamento de neutrófilos. ⁹⁴

O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de I/R e disfunção microvascular, trouxe um crescente interesse em investigar estratégias capazes de diminuir suas conseqüências deletérias. A privação do aporte sanguíneo aos tecidos é a principal causa de mortalidade em todo o mundo, devido a elevada incidência de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico, 95 mas diversas outras situações clínicas como trauma e choque

hemorrágico, transplante de órgãos e reconstruções arteriais maiores possuem em comum a agressão causada pela isquemia tecidual e a posterior reperfusão.

Dentre as intervenções investigadas para a redução da lesão de I/R, uma das mais importantes foi publicada por Murry et al. em 1986, que descreveram o fenômeno do precondicionamento isquêmico (PCI). O PCI consiste na exposição dos tecidos a períodos curtos de isquemia e reperfusão antes da isquemia prolongada. Estes autores obtiveram uma diminuição de 70% da área de infarto do miocárdio em cães precondicionados que foram submetidos a 40 minutos de isquemia miocárdica.⁹⁶

Posteriormente, foi descrita uma segunda janela de proteção (SWOP – second window of protection) que se desenvolve entre 12 e 24 horas após o estímulo precondicionante. Ao contrário da proteção imediata que dura 2 a 3 horas, esta fase tardia de proteção se prolonga por 48 a 96 horas, embora com menor intensidade. Assim, o fenômeno do PCI pode ser temporalmente dividido em duas formas: o PCI inicial ou clássico e o PCI tardio (figura 3). Estes dois momentos de proteção, além de diferentes magnitudes, possuem também mecanismos distintos. O primeiro depende principalmente de uma reposta adaptativa imediata através de moléculas efetoras já formadas, e o segundo resulta de nova síntese protéica por alterações de expressão gênica. Se constant de nova síntese protéica por alterações de expressão gênica.

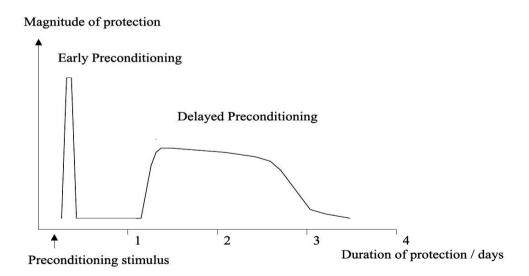


Figura 3: Proteção bifásica induzida por um episódio de precondicionamento isquêmico. Adaptado de Pasupathy S e Homer-Vanniasinkam S. 99

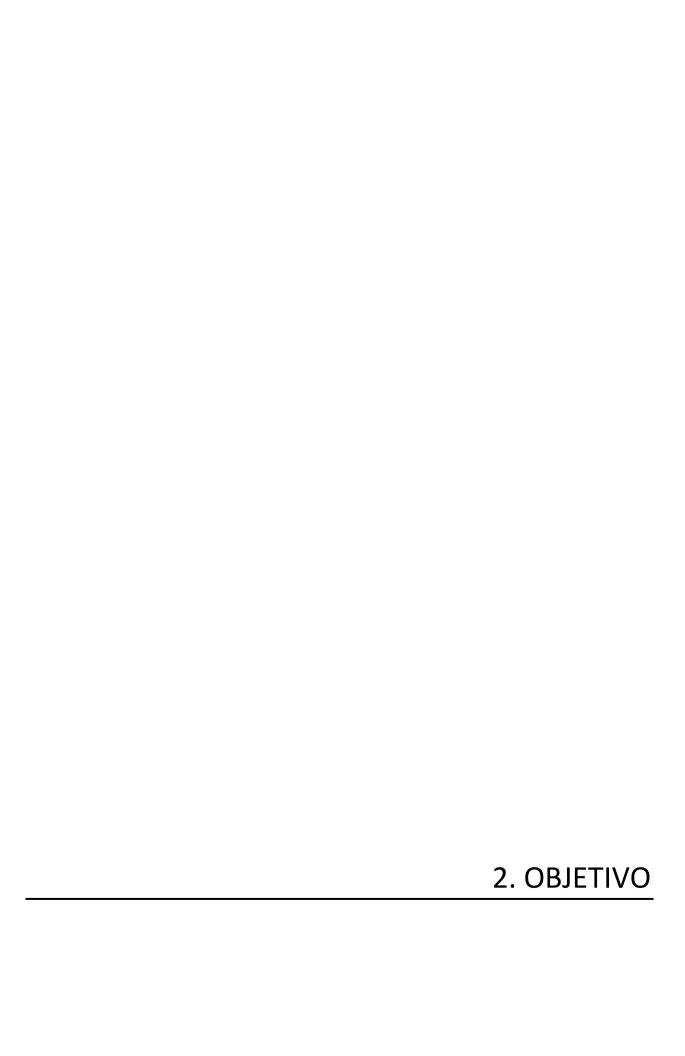
Em 1993, Przyklenk et al. descreveram que após um breve período de I/R no território da artéria coronária circunflexa, a área de infarto no território da artéria descendente anterior foi reduzida. Assim, foi identificado que o PCI em um leito vascular conferia proteção em outro leito vascular, embora ambos em um mesmo órgão.

Investigações posteriores mostraram que existia também uma proteção entre diferentes órgãos. Gho et al. demonstraram que o PCI remoto em um território visceral conferiu proteção contra a lesão de I/R miocárdica. Outros estudos confirmaram o efeito protetor do PCI realizado em outros órgãos, como rim e músculo esquelético, sobre a lesão de I/R no tecido cardíaco. 102, 103

Embora avaliado em diversos órgãos isolados, como fígado, 104 rim, 105 e intestino, 106 por exemplo, a grande maioria dos estudos sobre o PCI local ou remoto esteve focada na proteção miocárdica.

Para o estudo da lesão de I/R em cirurgia de aorta, alguns autores criaram modelos de pinçamento de aorta supracelíaca^{107, 108} ou simulando uma situação de aneurisma roto de aorta abdominal.^{109, 110} No entanto, todas estas investigações foram direcionadas para o papel de mediadores inflamatórios, como complemento e interleucinas, na lesão de I/R, sem testar manobras de PCI. Recentemente foi publicado um estudo experimental mostrando o efeito benéfico do PCI remoto sobre a lesão de I/R renal causada pelo pinçamento da aorta supracelíaca.¹¹¹ Mesmo assim as investigações sobre o PCI em procedimentos de aorta com isquemia multivisceral ainda são bastante limitadas.

Desta forma, com a finalidade de encontrar alternativas que possam minimizar a lesão de I/R em procedimentos envolvendo o pinçamento da aorta com isquemia esplâncnica e muscular, consideramos a hipótese que o PCI aplicado de forma local ou remota possa minimizar a disfunção microcirculatória que se estabelece.



2. OBJETIVO

- 1. Testar a hipótese que o precondicionamento isquêmico local ou remoto minimiza a disfunção endotelial na microcirculação mesentérica, induzida pela lesão de I/R causada pela oclusão temporária da aorta supracelíaca, através da:
 - a. avaliação in-vivo das interações leucócito-endotélio;
 - b. avaliação da expressão de moléculas de adesão;
 - c. avaliação das variações hemodinâmicas e laboratoriais, e as repercussões histopatológicas da mucosa intestinal.



3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental foi realizado no Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiologia da Circulação, Laboratório de Investigação Médica 11 (LIM-11), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As normas internacionais para o cuidado, manipulação e estudo de animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob protocolo de número 1016/06.

3.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar EPM-1 com peso entre 190 a 250g obtidos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da UNIFESP. Os animais foram transportados ao biotério do LIM 11 da FMUSP, respeitando-se um período mínimo de três dias de adaptação ao novo ambiente antes da realização dos experimentos. Os animais tiveram livre acesso à ração e à água, em ambiente controlado para temperatura, umidade e exposição à luz artificial, com ciclos claro e escuro de 12 h.

Foram utilizados sete animais por grupo para avaliação *in-vivo* da microcirculação e outros sete animais por grupo para coleta de tecidos.

3.2 Modelo experimental

3.2.1 Pré-operatório

Os procedimentos foram sempre iniciados no período matutino, obedecendo um jejum para alimentos sólidos na noite precedente ao ato operatório, com livre acesso à água.

3.2.2 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral com pentobarbital sódico (Sigma – St Luis, EUA) na dosagem de 50 mg/kg, por via intraperitoneal. Doses complementares de pentobarbital sódico foram administradas na dosagem de 4 mg/kg por via intravenosa, quando necessário, para manutenção do plano anestésico estável ao longo do procedimento.

3.2.3 Preparação cirúrgica

Após a anestesia, os animais foram atados em decúbito dorsal sobre uma placa metálica, procedendo-se a antissepsia com iodopovidine e tricotomia da região abdominal e cervical.

Através de uma cervicotomia antero-lateral direita obteve-se acesso à via aérea para a realização de uma traqueostomia com a inserção de cateter intravascular de 16 gauge (1,7 mm) de diâmetro, seccionado para que tivesse 2cm de comprimento (figura 4).

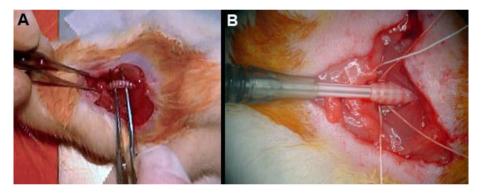


Figura 4: Preparo da via aérea. Cervicotomia e dissecção da traquéia (A). Traqueostomia com a inserção de cateter intravascular modificado (B).

Em seguida, dissecou-se a veia jugular externa e a artéria carótida comum para a inserção de cateteres de polietileno de diâmetro compatível (PE-50 conectado a PE-10) (figura 5). O acesso venoso foi utilizado para a injeção de solução salina 0,9%, heparina e anestésico. A via arterial foi conectada a um transdutor de pressão ligado em um sistema de aquisição de dados biológicos (modelo MP 100, Biopac System Inc., Goleta, CA – EUA), registrados em um computador através de software específico (ACqKnowledge III MP 100 WSW).

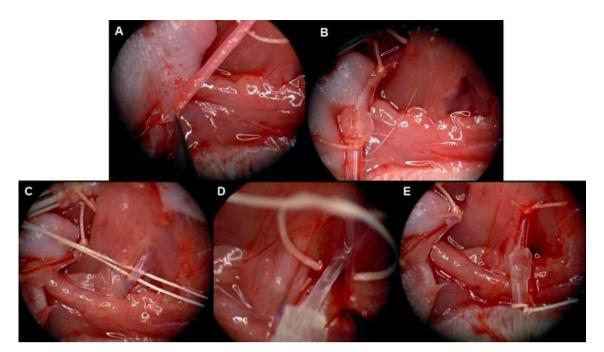


Figura 5: Acessos vasculares observados através de lupa com magnificação de 10x. Arteriotomia da carótida comum (A) para inserção de cateter de polietileno (B). Dissecção da veia jugular externa (C) e inserção de cateter de polietileno(D). Aspecto final dos cateter intravasculares fixados (E).

O acesso à aorta abdominal foi realizado por celiotomia mediana. A aorta abdominal foi dissecada em sua porção supracelíaca junto aos pilares diafragmáticos (figura 6) e infrarrenal logo acima de sua bifurcação (figura 7). Nestes dois locais a aorta foi reparada com fio de algodão 0. Estes fios foram passados pelo interior de um tubo flexível de polietileno (PE 100) de 4 cm de extensão, formando um torniquete de Rumel que possibilitou a oclusão deste vaso em qualquer um destes pontos com a tração dos fios contra o tubo de polietileno.



Figura 6: Dissecção da aorta abdominal supracelíaca (A). Reparo com fio de algodão 0 (B) para a confecção de torniquete de Rumel (C).

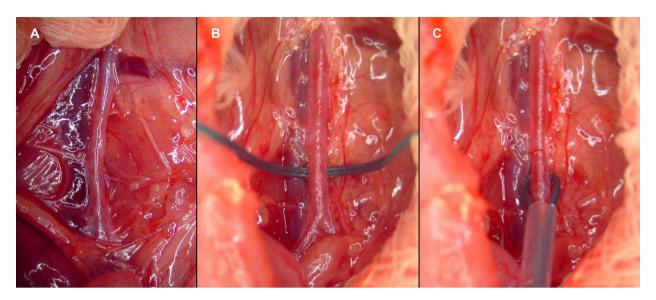


Figura 7: Dissecção da aorta abdominal infrarrenal (A). Reparo com fio de algodão 0 (B) para a confecção de torniquete de Rumel (C).

Após as dissecções vasculares, administrou-se 100 UI/Kg de heparina intravenosa. Procedeu-se então a síntese da parede abdominal com fio de mononylon 4-0, exteriorizando-se os torniquetes nas porções cranial e caudal da incisão para permitir sua manipulação e oclusão aórtica durante o experimento. Todos os animais foram mantidos sobre a placa metálica aquecida a 37 °C (figura 8).

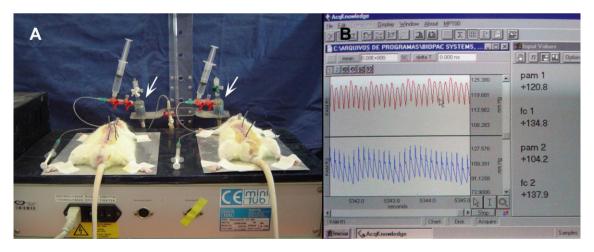


Figura 8: Posicionamento dos animais durante o experimento sobre placa metálica aquecida (A). Cateteres intra-arteriais foram conectados a transdutores (A – seta) para aquisição das medidas da pressão arterial em programa de computador específico (B).

3.3 Protocolo experimental e grupos de estudo

Os animais foram incluídos sem randomização em quatro grupos experimentais de forma simultânea até que fosse estabelecido um número de sete animais por grupo. Os animais foram submetidos à mesma preparação operatória em todos os grupos. O protocolo do experimento, com diferentes tempos de isquemia e reperfusão, variou conforme os grupos abaixo descritos (figura 9).

Grupo controle: Após a mesma preparação operatória dos demais grupos, os animais foram mantidos em repouso durante todo o período experimental, sem pinçamento da aorta.

Grupo isquemia e reperfusão (I-R): Os animais permaneceram em repouso por 40 minutos para então ser ocluída aorta abdominal supracelíaca por 20 minutos, seguido de 120 minutos de reperfusão.

Grupo precondicionamento isquêmico local (PCI-L): Após repouso de 20 minutos, a aorta abdominal supracelíaca foi ocluída duas vezes durante cinco minutos com intervalo de reperfusão de cinco minutos em cada tempo. Imediatamente após estes ciclos, a aorta supracelíaca foi ocluída por 20 minutos, seguido de 120 minutos de reperfusão.

Grupo precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R): Aorta abdominal infrarrenal foi ocluída logo acima da sua bifurcação duas vezes durante 10 minutos com intervalo de reperfusão de 10 minutos em cada tempo. Imediatamente após estes ciclos, a aorta supracelíaca foi ocluída por 20 minutos, seguido de 120 minutos de reperfusão.



Figura 9: Protocolo experimental nos quatro grupos de estudo. I: isquemia, R: reperfusão.

A estabilidade hemodinâmica dos animais durante a liberação da aorta supracelíaca ocluída por 20 minutos foi mantida pela expansão volêmica com 1,5 mL de solução salina 0,9%. Doses subseqüentes de 0,5 mL de solução salina 0,9% foram administradas após 30, 60, 90 e 120 minutos de reperfusão. Estes volumes, incluindo os 1,5 mL iniciais, foram aplicados a todos os grupos de estudo nos mesmos tempos experimentais.

Ao final do experimento, os animais avaliados pela microscopia intravital foram sacrificados com overdose de pentobarbital, e os animais utilizados para coleta tecidos foram sacrificados por exsangüinação com punção aórtica.

3.4 Variáveis analisadas

3.4.1 Análise hemodinâmica – pressão arterial média

A pressão arterial média foi monitorizada continuamente e registrada a cada cinco minutos durante os tempos correspondentes as manobras de PCI (t0 a t40) e a cada dez minutos no restante do experimento (t40 a t180). Os valores foram expressos em mm Hg.

3.4.2 Análise laboratoriais

Sangue arterial foi coletado através do cateter vascular posicionado na artéria carótida comum, e utilizado para análise gasométrica, concentração de lactato e potássio (Gasometro ABL 555, Radiometer – Copenhagen, Dinamarca).

Para a dosagem do hematócrito e leucograma foi extraído sangue periférico misto da área cruenta da secção transversa dos dois milímetros finais da cauda animal. O hematócrito foi determinado em tubo capilar de micro-hematócrito em microcentrífuga, com centrifugação a 9000 g por 5 minutos. O leucograma foi realizado pela contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer e o diferencial obtido pela leitura do esfregaço sangüíneo, corado pelo método de Giemsa-May-Grünwald.

Para dosagem de desidrogenase lática (DHL) foi coletado sangue por punção aórtica no final do procedimento, e analisado na divisão de laboratório central HCFMUSP (protocolo 391).

3.4.3 Análise in-vivo da microcirculação – microscopia intravital

Os animais foram observados ao final do experimento. Devido ao tempo necessário para preparação do animal para esta avaliação, esta etapa foi iniciada aos 90 minutos de reperfusão, para que o estudo microcirculatório não ocorresse tardiamente. A avaliação *in-vivo* da microcirculação foi feita por pesquisador independente, cego para os grupos experimentais da amostra.

Os animais foram mantidos sobre uma placa acrílica aquecida a 37 °C em decúbito lateral direito para a exteriorização do leito vascular mesentérico e observação da microcirculação (figura 10). A preparação foi mantida úmida e aquecida por superfusão com solução tampão (pH 7,2 a 7,4) de Krebs-Henseleit composta de 113 mmol/L de NaCl, 4.7 mmol/L de KCl, 2.5 mmol/L de CaCl2.2H2O, 25 mmol/L de NaHCO3, 1.1 mmol/L de MgSO4, 1.1 mmol/L de KH2PO4 e 5 mmol/L de glicose.

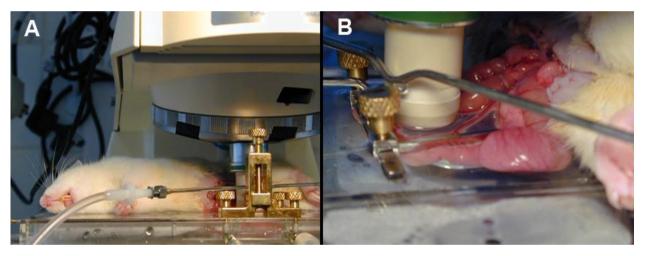


Figura 10: Posicionamento do animal sobre placa acrílica aquecida (A), com exposição do mesentério para observação microscópica intravital (B).

As interações dos leucócitos com a superfície do endotélio venular foi estudada em vênulas pós-capilares de 12 a 20 μ m de diâmetro. O número de leucócitos que se moveram na periferia, em contato com o endotélio, foi determinado durante 10 minutos, em segmento de 100 μ m de extensão da vênula. O número de células que permaneceram aderidas ao endotélio, por mais de 30 segundos, foi determinado em extensão de 100 μ m da vênula. Leucócitos migrados para o tecido perivascular foram contados em área equivalente a 5.000 μ m².

Uma câmera (TK-C1380U, JVC Co, Tokyo, Japan) incorporada a um microscópio triocular (Axioplan 2, Carl Zeiss Co, München-Hallbergmoos, Germany) facilitou a observação de imagens ampliadas (425x) no monitor do microcomputador (SyncMaster 753DFX, Samsung, Manaus, Brasil). A análise das interações leucócito-endotélio foi realizada em tempo real com a utilização de software de imagem (Axiovision 4.1, Carl Zeiss Co) com módulo incorporado para mensuração interativa e cronometragem. As imagens foram armazenadas e reanalisadas posteriormente.

3.4.4 Análise imuno-histoquímica

O mesentério foi completamente ressecado desde sua origem até as alças intestinais. Em seguida foi imerso em hexana sob nitrogênio líquido por 2 minutos para congelação gradual. Congelada, a peça foi levada para o criostato a temperatura de -25 °C onde foram processados cortes de 8 µm de espessura para montagem de 5 lâminas para cada animal (3 testes, 1 controle negativo e 1 para coloração com hematoxilina).

Para a realização das reações imuno-histoquímicas indiretas utilizamos anticorpos associados à fluoresceina. O boqueio de sítios inespecíficos foi feito pela incubação dos cortes em solução tampão livre de biotina (Super Block[®] Blocking Buffer – Pierce) por período aproximado de 16 horas ("overnight") a 4 °C.

Os anticorpos contra ICAM-1 (M-19: sc-1511, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), P-selectina (C-20: sc-6941, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) and E-selectina (H-300: sc-14011, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluidos em solução tampão fosfato (PBS - phosphate buffered saline) com Tween₂₀ a 0,3% na proporção 1:50 e sobrepostos aos cortes para incubação por período de aproximadamente 16 horas ("overnight") a 4 °C. Após essa incubação, as lâminas foram submetidas a três banhos em PBS simples por 10 minutos cada. Em seguida, foi feita a incubação com estreptoavidina fluoresceinada na proporção de 1:200 por 1 hora em temperatura ambiente e novamente submetidas a três banhos em PBS simples por 10 minutos cada. Por fim, as lâminas foram incubadas em meio especial de lodeto de Propidium e sobrepostas com laminulas abrangentes. Todas as reações controles foram realizadas de forma semelhante, mas substituindo o anticorpo por PBS com Tween₂₀ a 0,3%.

A quantificação da marcação das moléculas de adesão foi feita por pesquisador independente, cego para os grupos experimentais da amostra utilizando análise qualitativa e

comparativa por contrastes de imagens em software específico (Image-Pro-Plus da Média Cybernetics, versão 4.0 for windows) para microscópio E-800 (Nikon).

3.4.5 Análise histopatológica

O intestino foi separado do mesentério e três amostras de tecido foram coletadas em locais pré-definidos: 3 cm após o início do jejuno, porção média do intestino delgado e ílio distal a 3 cm do ceco. Os tecidos foram fixados por 24hs em solução de formol 10% tamponada, e então imersas em bloco de parafina. Os cortes foram feitos com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina.

A análise histológica morfométrica foi realizada por histologista independente, cego para os grupos experimentais da amostra. As imagens foram capturadas em câmera de alta resolução (Samsung) acoplada a um microscópio óptico E200 (Nikon), e analisadas em software específico (AxioVision-Rel Zeiss).

As variáveis medidas foram a espessura total da mucosa, a altura da vilosidade e a profundidade da cripta, sendo também determinado a relação entre a altura da vilosidade e a profundidade da cripta. Para cada uma destas variáveis, foram adquiridas três medidas em cada uma das três porções do intestino coletadas, de forma que o valor final de um animal foi a média de nove medidas desta variável.

3.5 Metodologia estatística

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Excel[®], e analisados no programa SPSS[®] (*Statistical Package for Social Sciences 13.0*). A apresentação dos resultados ocorreu através de medidas descritivas, expressos como média ± erro padrão.

A análise exploratória da distribuição dos dados foi realizada través do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para a comparação de medidas repetidas em um mesmo grupo foi utilizado o teste t-Student para amostras pareadas. Para a comparação de médias entre os grupos foi utilizado a Análise de Variância (*One-Way*), onde o pressuposto básico da homocedasticidade foi verificado pelo teste de *Levene*. Nas situações onde não se configurou a homogeneidade de variâncias, a Anova foi complementada pela estatística de *Welch* (comparação de grupos de tamanhos diferentes) ou de *Brown-Forsythe* (comparação de grupos

de tamanhos iguais), que são robustos a violação da premissa de homogeneidade de variância. Para as comparações múltiplas foram utilizados os teste de *Tukey* (homogeneidade de variâncias e grupos de igual tamanho), *Tamhane* (heterogeneidade de variâncias e grupo de tamanhos iguais) *e Dunnett's T3* (heterogeneidade de variâncias e grupos de tamanho diferentes). Foi adotado nível de significância para erro α de 5% (p<0,05).



4. RESULTADOS

O valor médio e erro-padrão de cada grupo (média ± EP) estão apresentados em gráficos. Os resultados foram calculados com um número de sete animais por grupo, a exceção das variáveis peso e pressão arterial média, nas quais foi realizada a análise estatística com o número total de animais em cada grupo, ou seja, 14. Os valores individuais de cada animal, em cada momento do experimento, estão dispostos em tabelas nos Anexos.

4.1 Peso dos animais

O peso médio foi de 219±2 g, não havendo diferença entre os grupos (Controle: 214±4 g; I-R: 216±5 g; PCI-L: 221±4 g; PCI-R: 224±5 g, p=0,458) (figura 11). Os valores individuais de peso de cada grupo encontram-se em Anexos – Tabela 1.

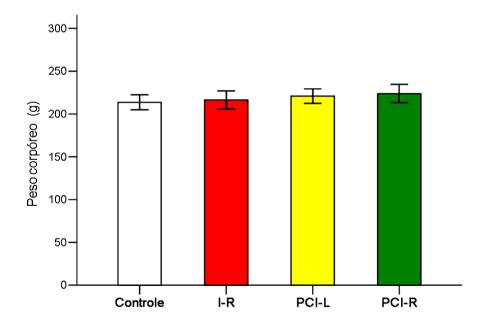


Figura 11: Peso dos animais (g) nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 14 animais por grupo.

4.2 Variável hemodinâmica - pressão arterial média

As figuras 11 a 14 ilustram as variações da PAM em cada grupo. Os valores individuais da PAM em cada momento experimental são apresentados em Anexos – Tabela 2. A figura 15 ilustra comparativamente a PAM (média ± EP) entre os grupos.

No grupo controle o procedimento iniciou com uma PAM de 99,00±4,82 mm Hg. Houve um aumento progressivo da PAM desde o tempo basal até o tempo t110 minutos (t15: 106,64±5,20 mm Hg, p=0,038 vs. t0; t40: 112,92±4,62 mm Hg, p<0,001 vs. t0; t110: 126,71±3,99 mm Hg, p=0,009 vs. t40). A partir deste momento a PAM manteve-se estável até o final do experimento (t180: 127,85±4,59 mm Hg, p=0,649 vs. t110) (figura 12).

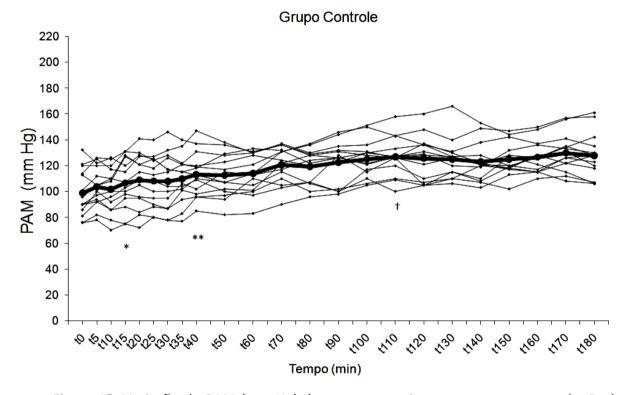


Figura 12: Variação da PAM (mm Hg) durante o experimento no grupo controle. Dados individuais e médios de 14 animais. (*) p<0,05 vs. t0, (**) p<0,001 vs. t0, (†) p<0,009 vs. t40.

No grupo I-R, a PAM basal foi de 110,07±4,06 mm Hg. Neste grupo também ocorreu elevação da PAM nos primeiros 40 minutos do experimento, sendo significativo a partir do tempo 20 (t20: 115,85±4,23 mm Hg, p=0,012 vs. t0). A oclusão da aorta supracelíaca elevou a PAM, quando comparada ao tempo basal (t40: 184,35±3,71 mm Hg, p<0,001 vs. t0) e ao tempo imediatamente antecedente (t35: 120,35±3,09 mm Hg, p<0,001 vs. t40). A liberação da aorta

resultou em uma queda da PAM (t50 vs. t60: 178,5±2,98 mm Hg para 62,28±1,84 mm Hg, p<0,001), para valores inferiores ao tempo basal ou ao tempo imediatamente anterior à oclusão aórtica (ambos, p<0,001). Após esta queda, ocorreu a elevação da PAM, chegando próximo ao valor basal depois de 20 minutos de reperfusão (t80: 99,64±4,91 mm Hg, p=0,148 vs. t0). Deste momento até completar a primeira hora de reperfusão houve uma recuperação progressiva da PAM (t120: 113,0±2,77 mm Hg, p=0,012 vs. t80). Durante a segunda hora de reperfusão houve queda da PAM (t180: 105,71±3,31 mm Hg, p=0,014 vs. t120), mas o valor final da PAM foi semelhante ao basal (p=0,453), embora significativamente inferior ao momento prévio do pinçamento aórtico (p=0,009) (figura 13).

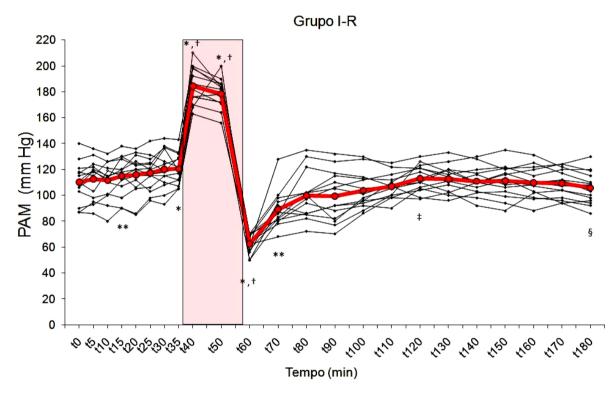


Figura 13: Variação da PAM (mm Hg) durante o experimento no grupo isquemia e reperfusão (I-R). Dados individuais e médios de 14 animais. (*) p<0,001: VS. t0, (**) p<0,05 vs. t0, (†) p<0,001 vs. t35, (‡) p=0,012 vs. t80 (§) p=0,014 vs. t120 e p=0,009 vs. t35.

No grupo PCI-L, a PAM basal foi de 109,14±3,36 mm Hg. A oclusão aórtica supracelíaca empregado por duas vezes como precondicionamento, durante cinco minutos, e de forma mais prolongada, por vinte minutos, elevou a PAM em todos os momentos em que foi realizado, quando comparado ao tempo basal (t20: 174,85±3,54 mm Hg, p<0,001 vs. t0; t30: 179,42±3,21 mm Hg, p<0,001 vs. t0; t40: 179,21±3,92 mm Hg, p<0,001 vs. t0) e ao tempo imediatamente

antecedente à primeira oclusão (t15: 114,78±2,57 mm Hg, p<0,001 vs. t20, t30 e t40). A liberação da aorta em todos os tempos resultou em uma queda da PAM (t25: 64,92±1,54 mm Hg, p<0,001 vs. t20; t35: 70,21±2,17 mm Hg, p<0,001 vs. t30; t60: 67,50±1,67 mm Hg, p<0,001 vs. t50), para valores também inferiores ao tempo basal e t15 (todos, p<001). Houve retorno da PAM para um valor próximo ao nível basal após 40 minutos do início da reperfusão final, (t100: 103,71±2,47 mm Hg, p=0,163 vs. t0). Deste momento até o término do experimento, mantevese um aumento da PAM (t180: 112,21±2,80 mm Hg, p=0,031 vs. t100), finalizando o experimento com um valor semelhante ao basal (p=0,180) e t15 (p=0,522) (figura 14).

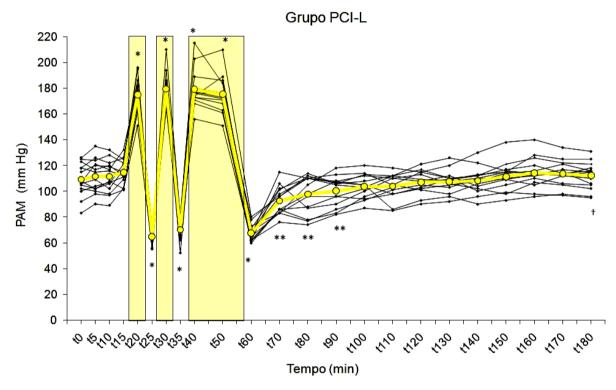


Figura 14: Variação da PAM (mm Hg) durante o experimento no grupo precondicionamento local (PCI-L). Dados individuais e médios de 14 animais. (*) p<0,001: vs. t0 e t15, (**) p<0,05 vs. t0, (†) p=0,031 vs. t100.

No grupo PCI-R, o experimento foi iniciado já com a oclusão da aorta infrarrenal, e a PAM basal foi de 104,71±2,96 mm Hg. A liberação da aorta levou a uma queda da PAM (t5 vs. t10: 106,64±2,78 mm Hg para 87,28±2,87 mm Hg, p<0,001), elevando-se após 5 minutos (t15: 105,21±3,44 mm Hg, p<0,001 vs. t10). A segunda oclusão da aorta infrarrenal no tempo t20 não aumentou significativamente a PAM (t20: 110,21±3,68 mm Hg, p=0,084 vs. t15), mantendo também valor semelhante ao basal (p=0,120). A liberação da aorta novamente levou a uma

queda da PAM (t25 vs. t30: 113,42±3,54 mm Hg para 88,57±2,41 mm Hg, p<0,001), seguida de elevação nos minutos subseqüentes (t35: 111,14±3,44 mm Hg, p<0,001 vs. t30). A oclusão aórtica supracelíaca elevou a PAM quando comparada ao tempo basal e ao tempo imediatamente antecedente (t40: 175,50±4,86 mm Hg, p<0,001 vs. t0 e t35). A PAM com o pinçamento supracelíaco também foi maior que a PAM com o pinçamento infrarrenal (p<0,001 t40 vs. t0 e t20). A liberação da aorta resultou em queda da PAM (t50 vs. t60: 172,92±3,97 mm Hg para 67,35±1,94 mm Hg, p<0,001), a um valor inferior aos tempos basal e imediatamente anterior à oclusão supracelíaca (ambos, p<0,001). Após esta queda, houve um aumento da PAM, alcançando valor próximo ao basal em 20 minutos (t80: 96,92±3,44 mm Hg, p=0,114 vs. t0). Nos momentos subseqüentes manteve-se a elevação da PAM (t120: 112,42±2,82 mm Hg, p=0,001 vs. t80; 180: 112,64±3,03 mm Hg, p=0,008 vs. t80). No final do experimento a PAM era semelhante aos valores basal (p=0,139) e imediatamente anterior à oclusão supracelíaca (p=0,768) (figura 15).

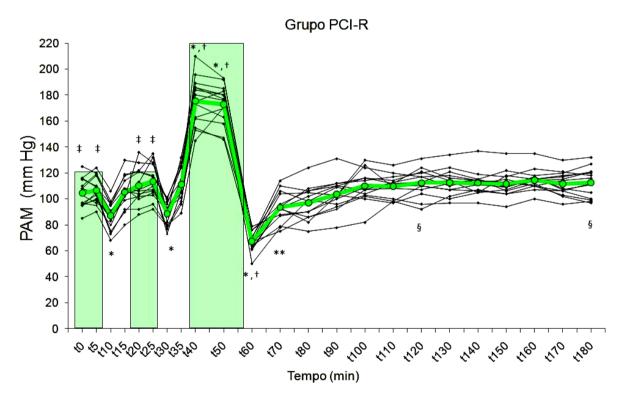


Figura 15: Variação da PAM (mm Hg) durante o experimento no grupo precondicionamento remoto (PCI-R). Dados individuais e médios de 14 animais. (*) p<0,001 vs. t0, (**) p=0,022 vs. t0, (†) p<0,001 vs. t35 e (‡) p<0,001 vs. t40, (§) p<0,01 vs. t80.

Entre os grupos, não houve diferença significativa na PAM no momento basal (p=0,177). Em relação ao controle, a oclusão aórtica supracelíaca no grupo PCI-L aumentou a PAM nos dois momentos em que foi realizado como precondicionamento (t20 e t30: p<0,001). Já a oclusão aórtica infrarrenal, utilizado como precondicionamento no grupo PCI-R, não elevou a PAM em relação ao controle (t0: p=0,725; t20: p=0,997). Ainda durante as manobras de PCI, a PAM nos momentos da liberação da aorta no grupo PCI-L foi menor que o grupo controle (t25 e t35: p<0,001), achado também presente no grupo PCI-R (t10: p=0,042; t30: p=0,036).

A oclusão aórtica supracelíaca realizado no tempo t40 resultou em um aumento significativo da PAM em todos os grupos quando comparado ao controle (p<0,001), sem diferença entre estes grupos (I-R, PCI-L e PCI-R: p=0,336). Comparada ao controle, a restauração do fluxo aórtico resultou em queda da PAM (p<0,001), de forma semelhante nestes três grupos (p=0,084). Durante toda a fase de reperfusão as diferenças na PAM não foram significativas nos três grupos submetidos à isquemia (p>0,05), mas mantendo-se, neste mesmo período, abaixo dos valores do grupo controle (p<0,05) (figura 16).

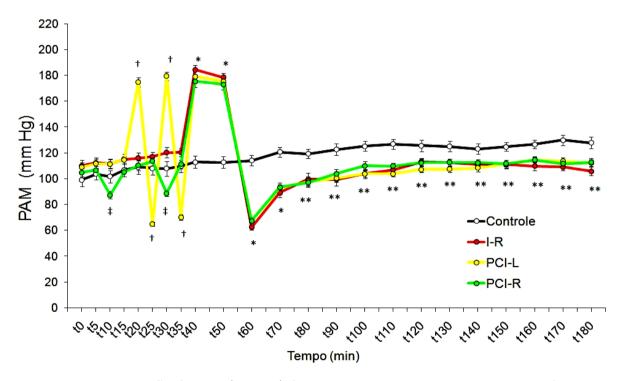


Figura 16: Variação da PAM (mm Hg) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 14 animais por grupo. (*) p<0,001: I-R, PCI-L e PCI-R vs. controle, (**) p<0,05: I-R, PCI-L e PCI-R vs. controle, (†) p<0,001 PCI-L vs. controle e (‡) p<0,05 PCI-R vs. controle.

4.3 Variáveis Laboratoriais

4.3.1 Gasometria arterial

pH arterial

A figura 17 ilustra os valores do pH arterial (média ± EP) por grupo. Os valores individuais do pH são apresentados em Anexos – Tabela 3.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais do pH arterial (p=0,503).

No grupo controle o pH arterial no momento final do experimento foi semelhante ao basal (7,387±0,015 para 7,375±0,017, p=0,599). No grupo IR houve uma queda significativa no pH arterial (7,425±0,019 para 7,280±0,035, p=0,006). Já nos grupos PCI-L e PCI-R, a queda do pH não foi significativa (PCI-L: 7,406±0,014 para 7,358±0,019, p=0,257; PCI-R: 7,415±0,021 para 7,347±0,024, p=0,184).

Embora tenha ocorrido uma queda significativa do pH no grupo IR, não houve diferença significativa nos valores do pH entre os grupos ao final do experimento (p=0,162).

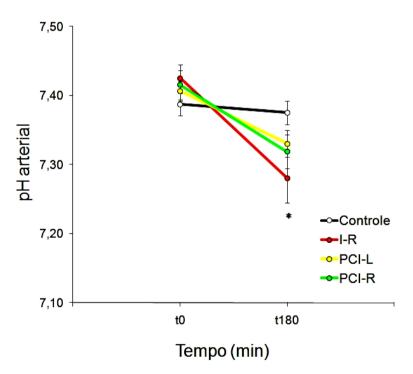


Figura 17: Variação do pH arterial durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,02 I-R vs. t0.

Excesso de base arterial

A figura 18 ilustra os valores do excesso de base (EB) arterial (média ± EP) por grupo. Os valores individuais do EB são apresentados em Anexos – Tabela 4.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais do EB arterial (p=0,755).

Em todos os grupos o EB arterial no momento final do experimento foi inferior ao basal (Controle: $-2,21\pm0,77$ mEq/L para $-6,25\pm0,46$ mEq/L, p=0,003; I-R: $-2,65\pm0,83$ mEq/L para $-15,81\pm1,64$ mEq/L, p<0,001; PCI-L: $-3,20\pm0,49$ mEq/L para $-11,60\pm1,19$ mEq/L, p=0,001; PCI-R: $-2,21\pm0,80$ mEg/L para $-11,47\pm1,14$ mEg/L,p=0,001).

Ao final do experimento, os valores do EB arterial nos grupos I-R, PCI-L e PCI-R foram inferiores ao controle (p<0,001 vs. I-R; p=0,020 vs. PCI-L; e p=0,024 vs. PCI-R). Os valores dos grupos PCI-L e PCI-R foram semelhantes (p=1,000), sem diferirem significativamente do grupo I-R (p=0,085 vs. PCI-L; p=0,073 vs. PCI-R).

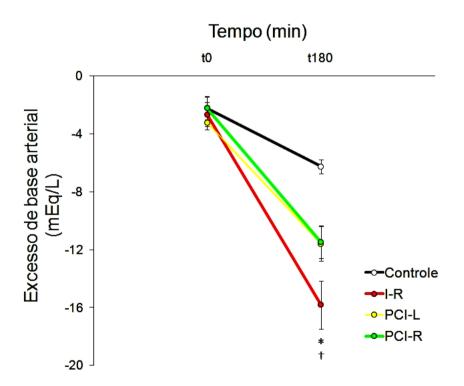


Figura 18: Variação do EB arterial (mEq/L) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p≤0,005 vs. t0, (†)p<0,03 I-R, PCI-L e PCI-R vs. controle.

Pressão Parcial de CO₂ Arterial

A figura 19 ilustra os valores da pCO_2 arterial (média \pm EP) por grupo. Os valores individuais da pCO_2 são apresentados em Anexos – Tabela 5.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais da p CO_2 arterial (p=0,172).

Em todos os grupos a p CO_2 arterial no momento final do experimento foi inferior ao basal (Controle: 35,97±1,18 mm Hg para 30,44±1,70 mm Hg, p=0,034; I-R: 31,45±0,94 mm Hg para 19,98±1,27 mm Hg, p<0,001; PCI-L: 32,57±1,84 mm Hg para 21,61±0,89 mm Hg, p=0,001; PCI-R: 33,62±1,57 mm Hg para 22,62±1,617 mm Hg, p=0,001).

Ao final do experimento, a p CO_2 arterial nos grupos I-R, PCI-L e PCI-R foi semelhante, mas significativamente abaixo do valor do grupo controle (p<0,001 vs. I-R; p=0,001 vs. PCI-L; p=0,003 vs. PCI-R).

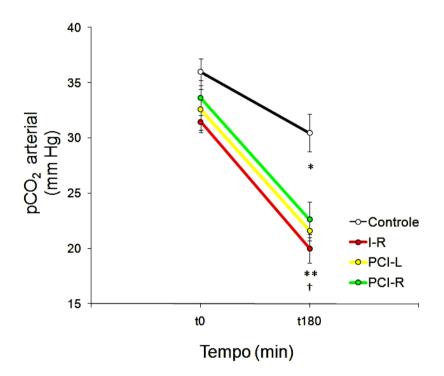


Figura 19: Variação da pCO₂ arterial (mm Hg) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média \pm EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,05 controle vs. t0, (**)p \leq 0,001 I-R, PCI-L e PCI-R vs. t0, (†)p<0,005 I-R, PCI-L e PCI-R vs. controle.

Concentração de HCO₃ arterial

A figura 20 ilustra os valores da concentração de HCO₃ arterial (média ± EP) por grupo.

Os valores individuais do HCO₃ são apresentados em Anexos – Tabela 6.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais do HCO₃ arterial (p=0,370).

Em todos os grupos o HCO_3^- arterial no momento final do experimento foi inferior ao basal (Controle: 21,58±0,44 mEq/L para 17,27±0,44 mEq/L, p=0,002; I-R: 20,25±0,55 mEq/L para 9,30±0,95 mEq/L, p<0,001; PCI-L: 20,10±0,71 mEq/L para 11,77±0,59mEq/L, p<0,001; PCI-R: 21,07±0,593 mEq/L para 11,80±0,80 mEq/L, p<0,001)

Ao final do experimento, o HCO₃ arterial nos grupos I-R, PCI-L e PCI-R foi inferior ao controle (p<0,001). Os valores dos grupos PCI-L e PCI-R foram semelhantes (p=1,000), sem diferirem significativamente do grupo I-R (p=0,103 vs. PCI-L; p=0,098 vs. PCI-R).

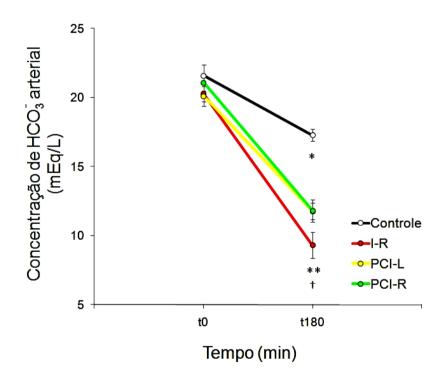


Figura 20: Variação da concentração de HCO₃ arterial (mEq/L) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p=0,002 controle vs. t0, (**)p≤ 0,001 I-R, PCI-L e PCI-R vs. t0, (†)p<0,01 I-R, PCI-L e PCI-R vs. controle.

Pressão parcial de O₂ arterial

A figura 21 ilustra os valores da pO_2 arterial (média \pm EP) por grupo. Os valores individuais da pO_2 são apresentados em Anexos – Tabela 7.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais da pO_2 arterial (p=0,668).

Em todos os grupos a p O_2 arterial no momento final do experimento foi superior ao basal, mas significativo apenas no grupo I-R (Controle: 98,55 \pm 5,89 mm Hg para 105,62 \pm 7,04 mm Hg, p=0,400; I-R: 97,0000 \pm 4,54 mm Hg para 112,91 \pm 3,39 mm Hg, p=0,042; PCI-L: 100,61 \pm 6,44 mm Hg para 108,92 \pm 4,08 mm Hg, p=0,245; PCI-R: 91,67 \pm 3,72 mm Hg para 100,61 \pm 4,13 mm Hg, p=0,173).

Ao final do experimento, não houve diferença significativa entre os grupos nos valores da pO_2 arterial (p=0,352).

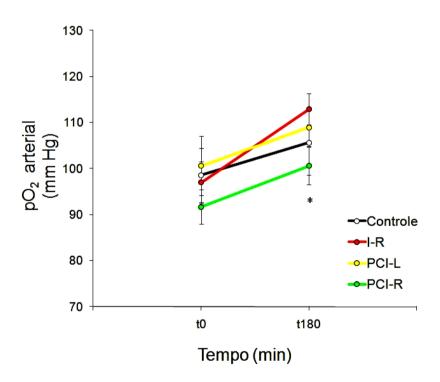


Figura 21: Variação da p O_2 arterial (mmHg) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média \pm EP de 7 animais por grupo. (*)p=0,04 I-R vs. t0.

Saturação de O₂ arterial

A figura 22 ilustra os valores da saturação de O_2 arterial (média \pm EP) por grupo. Os valores individuais da saturação de O_2 arterial são apresentados em Anexos – Tabela 8.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais da saturação de O_2 arterial (p=0,668).

Em nenhum dos grupos a saturação de O_2 arterial aumentou significativamente ao final do experimento (Controle: 97,17 \pm 0,46% para 97,57 \pm 0,38%, p=0,450; I-R: 97,22 \pm 0,45% para 97,81 \pm 0,21%, p=0,248; PCI-L: 97,34 \pm 0,43% para 97,90 \pm 0,21%, p=0,309; PCI-R: 96,77 \pm 0,30% para 97,14 \pm 0,45%, p=0,572).

Ao final do experimento, não houve diferença significativa entre os grupos nos valores da saturação arterial de O_2 (p=0,770).

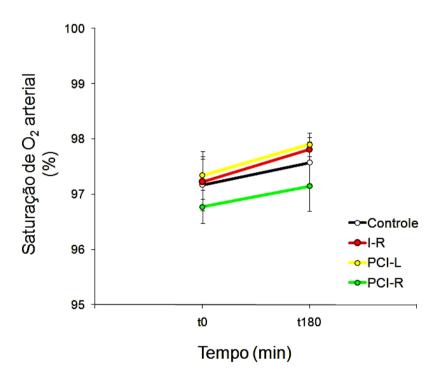


Figura 22: Variação da saturação de O₂ arterial (%) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo.

4.3.2 Potássio arterial

A figura 23 ilustra as concentrações de potássio arterial (média ± EP) por grupo. Os valores individuais da concentração de potássio arterial são apresentados em Anexos – Tabela 9.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais da concentração de potássio arterial (p=0,142).

Apenas no grupo I-R a concentração de potássio arterial no final do experimento foi significativamente superior à basal (Controle: 3,05±0,18 mEq/L para 3,47±0,10 mEq/L, p=0,051; I-R: 3,11±0,19 mEq/L para 3,92±0,17 mEq/L, p=0,014; PCI-L: 3,08±0,14 mEq/L para 3,5±0,28 mEq/L, p=0,086; PCI-R: 3,07±0,25 mEq/L para 3,57±0,19 mEq/L, p=0,079).

Ao final do experimento, não houve diferença significativa entre os grupos nos valores da concentração de potássio arterial (p=0,041).

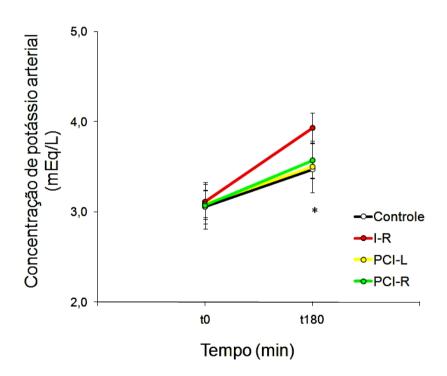


Figura 23: Variação das concentrações de potássio arteriais (mEq/L) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p=0,014 I-R vs. t0.

4.3.4 Lactato arterial

A figura 24 ilustra as concentrações de lactato arterial (média ± EP) por grupo. Os valores individuais das concentrações de lactato arterial são apresentados em Anexos – Tabela 10.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais da concentração de lactato arterial (p=0,142).

Em todos os grupos a concentração de lactato arterial no momento final do experimento foi superior ao basal (Controle: $1,18\pm0,82$ mmol/L para $1,65\pm0,10$ mmol/L, p=0,011; I-R: $1,5714\pm0,13$ mmol/L para $4,85\pm0,46$ mmol/L, p=0,001; PCI-L: $1,37\pm0,09$ mmol/L para $2,97\pm0,25$ mmol/L, p=0,003; PCI-R: $1,30\pm0,13$ mmol/L para $3,24\pm0,31$ mmol/L, p=0,004).

Ao final do experimento, as concentrações de lactato arterial nos grupos I-R, PCI-L e PCI-R foram maiores que no grupo controle (p<0,001 vs. I-R; p=0,032 vs. PCI-L; e p=0,008 vs. PCI-R). Os valores dos grupos PCI-L e PCI-R foram semelhantes (p=0,927), mas significativamente inferiores ao grupo I-R (p=0,001 vs. PCI-L; p=0,007 vs. PCI-R).

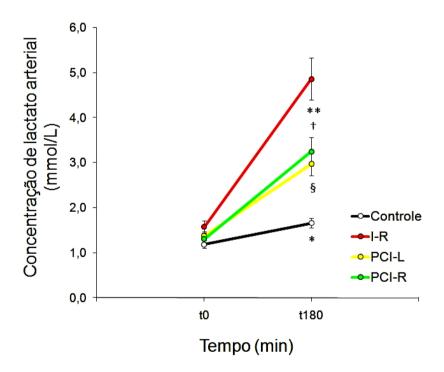


Figura 24: Variação das concentrações de lactato arterial (mmol/L) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP

de 7 animais por grupo. (*)p<0,02 controle vs. t0, (**)p \leq 0,005 I-R, PCI-L e PCI-R vs. t0, (†)p \leq 0,001 I-R, PCI-L e PCI-R vs. controle, (§)p<0,01 PCI-L e PCI-R vs. I-R.

4.3.4 Desidrogenase lática

A figura 25 ilustra os valores da concentração de desidrogenase lática (DHL) arterial (média ± EP) por grupo. Os valores individuais da DHL são apresentados em Anexos – Tabela 11.

Comparado ao grupo controle (1158,28±304,78 UI/L), houve um aumento significativo nos valores de DHL nos grupos I-R (9460±977,08 UI/L, p<0,001), PCI-L (6512±894,60 UI/L, p=0,002), PCI-R (4812,57±1213,84 UI/L, p=0,042). Os valores dos grupos PCI-L e PCI-R foram semelhantes (p=0,560), mas somente no grupo PCI-R a redução dos valores de DHL comparado ao I/R foi significativa (p=0,007)

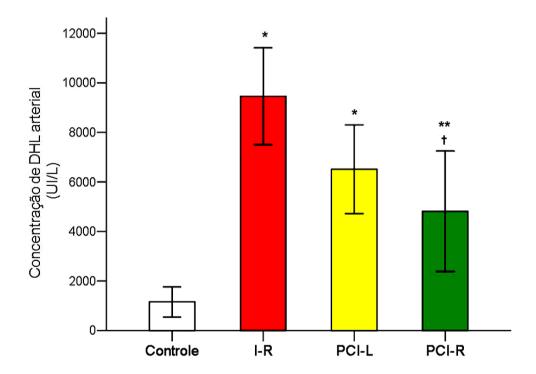


Figura 25: Concentração sérica de DHL arterial (UI/L) nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média \pm EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle, (**)p=0,05 vs. controle, (†)p=0,007 vs. I-R.

4.3.5 Hematócrito

A figura 26 ilustra os valores do hematócrito (média ± EP) por grupo. Os valores individuais do hematócrito são apresentados em Anexos – Tabela 12.

Não houve diferença entre os grupos nos valores basais do hematócrito (p=0,953).

No grupo controle o hematócrito no momento final do experimento foi semelhante ao basal ($49,42\pm1,84\%$ para $49,28\pm0,94\%$, p=0,946). Nos demais grupos houve um aumento significativo do hematócrito no término do experimento (I-R: $49,42\pm1,04\%$ para $56\pm2,17\%$, p=0,008; PCI-L: $49,71\pm1,06\%$ para $53,28\pm1,06\%$, p=0,012; PCI-R: $48,71\pm0,96\%$ para $52,28\pm1,04\%$, p=0,036).

Ao final do experimento, o hematócrito no grupo I-R foi significativamente maior que no grupo controle (p=0,012).

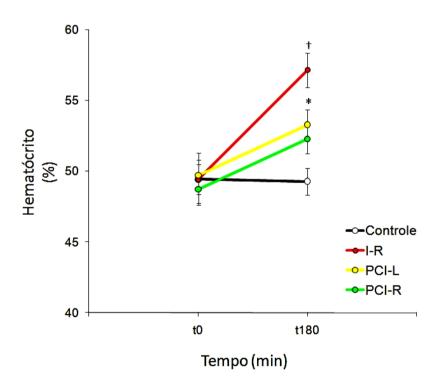


Figura 26: Variação do hematócrito (%) durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,05 I-R, PCI-L e PCI-R vs. t0, (†)p=0,012 I-R vs. controle.

4.3.6 Leucograma

Contagem total de leucócitos

A figura 27 ilustra os valores da contagem total de leucócitos (cel/mm³) em sangue periférico (média ± EP) por grupo. Os valores individuais da contagem total de leucócitos são apresentados em Anexos – Tabela 13.

Não houve diferença entre os grupos nas contagens basais de leucócitos (p=0,819).

Em todos os grupos o número de leucócitos no término do experimento foi superior ao basal (Controle: 12685,71±963,54 cel/mm³ para 16.664,28±1.315,96 cel/mm³, p<0,001; I-R: 12.392,85±1.177,48 cel/mm³ para 33.478,57±4.296,67 cel/mm³, p=0,001; PCI-L: 13.435,71±786,77 cel/mm³ para 29.278,57±2.597,75 cel/mm³, p=0,002; PCI-R: 12.250±826,56 cel/mm³ para 26.442,85±3.500,43 cel/mm³, p=0,004).

Comparado ao controle, a contagem de leucócitos no tempo final foi significativamente maior no grupo I-R (p=0,005), PCI-L (p=0,041), mas não no grupo PCI-R (p=0,149).

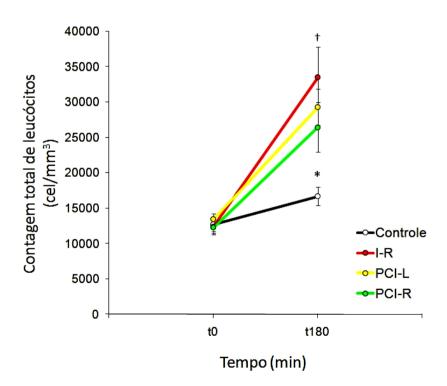


Figura 27: Variação da contagem de leucócitos durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,005 vs. t0, (†)p<0,05 I-R, PCI-L vs. controle.

Contagem de neutrófilos

A figura 28 ilustra os valores percentuais e sua tradução em valores absolutos da contagem de neutrófilos (média ± EP) por grupo. Os valores individuais (percentuais e absolutos) de neutrófilos são apresentados em Anexos – Tabela 14.

Não houve diferença entre os grupos no momento basal em valores percentuais (p=0,207) ou absolutos (p=0,250).

Em todos os grupos houve um aumento significativo no número de neutrófilos no término do experimento em valores percentuais (Controle: 26,14±2,28% para 68,57±6,65%, p=0,002; I-R: 20,42±1,42% para 71,57±4,43%, p<0,001; PCI-L: 26,28±3,15% para 75,42±2,77%, p<0,001; PCI-R: 22,42±1,75% para 68,14±3,07%, p<0,001) e absolutos (Controle: 3.336,35±437,91 cel/mm³ para 11.296,64±1.291,86 cel/mm³, p=0,001; I-R: 2.542,07±307,26 cel/mm³ para 24.236,64±3.913,74 cel/mm³, p=0,001; PCI-L: 3.571,28±524,77 cel/mm³ para 22.205,50±2.326,90 cel/mm³, p<0,001; PCI-R: 2.737,92±292,07 cel/mm³ para 18.464,57±3073,58 cel/mm³, p=0,001).

Ao final do experimento, não houve diferença nos valores percentuais entre os grupos (p=0,647). Considerando-se os valores absolutos, houve um aumento de neutrófilos em relação ao controle, significativo apenas nos grupos I-R (p=0,017).

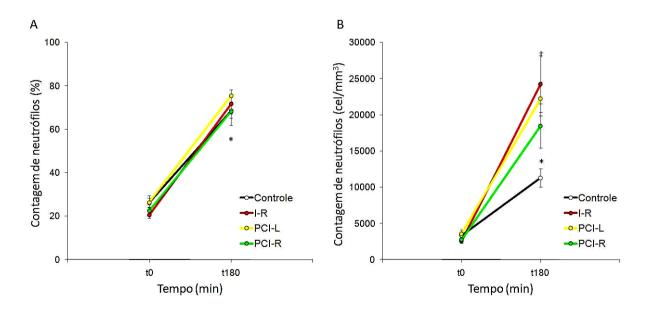


Figura 28: Variação da contagem de neutrófilos durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais

por grupo. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm 3). (*)p \leq 0,002 vs. t0, (†)p=0,017 I-R vs. controle.

Contagem de monócitos

A figura 29 ilustra os valores percentuais e sua tradução em valores absolutos da contagem de monócitos (média ± EP) por grupo. Os valores individuais (percentuais e absolutos) de monócitos são apresentados em Anexos – Tabela 15.

Não houve diferença entre os grupos no momento basal em valores percentuais (p=0,520) ou absolutos (p=0,873).

No grupo controle houve uma queda no número de monócitos no término do experimento em valores percentuais ($7\pm0.72\%$ para $2.71\pm0.47\%$, p=0.003) e também absolutos (892.71 ± 124.61 cel/mm³ para 464.50 ± 92.70 cel/mm³, p=0.012). Nos demais grupos houve uma redução significativa nos valores percentuais (I-R: $7.42\pm0.64\%$ para $3.85\pm0.55\%$, p=0.003; PCI-L: $6\pm0.69\%$ para $3.42\pm0.71\%$, p=0.009; PCI-R: $7\pm0.69\%$ para $4.42\pm0.78\%$, p=0.032), mas os valores absolutos permaneceram semelhantes (I-R: 914.21 ± 109.25 cel/mm³ para $1.246.07\pm188.30$ cel/mm³, p=0.130; PCI-L: 803.07 ± 103.54 cel/mm³ para $1.024.42\pm263.21$ cel/mm³, p=0.380; PCI-R: 841.42 ± 71.67 cel/mm³ para $1.086.50\pm194.49$ cel/mm³, p=0.257).

Ao final do experimento não houve diferença nos valores percentuais entre os grupos (p=0,311). Considerando-se os valores absolutos, a queda no grupo controle foi significativa comparada ao grupo I-R (p=0,042).

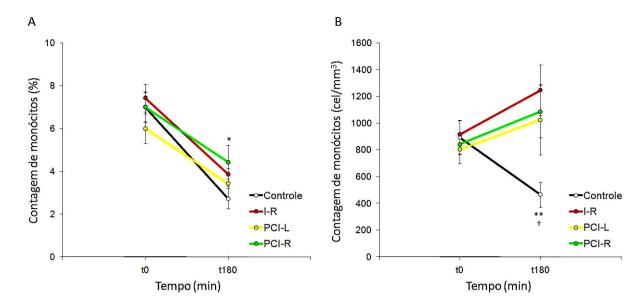


Figura 29: Variação da contagem de monócitos durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm³). (*)p<0,05 vs. t0, (**) p=0,012 controle vs. t0, (†)p=0,042 controle vs. I-R.

Contagem de linfócitos

A figura 30 ilustra os valores percentuais e sua tradução em valores absolutos da contagem de linfócitos (média ± EP) por grupo. Os valores individuais absolutos e percentuais de linfócitos são apresentados em Anexos – Tabela 16.

Não houve diferença entre os grupos no momento basal em valores percentuais (p=0,586) ou absolutos (p=0,908).

Em todos os grupos houve uma diminuição significativa no número de linfócitos ao término do experimento em valores percentuais (Controle: $66,57\pm2,24\%$ para $28,28\pm6,28\%$, p=0,002; I-R: 71,71±1,16% para $24,42\pm4,17\%$, p<0,001; PCI-L: $67,71\pm3,41\%$ para $20,85\pm2,48\%$, p<0,001; PCI-R: $69\pm2,91\%$ para $27,42\pm2,36\%$, p<0,001). Em valores absolutos esta diminuição foi significativa nos grupos controle e PCI-L (Controle: $8.424,21\pm654,10$ cel/mm³ para $4.824,42\pm1186,72$ cel/mm³, p=0,023; I-R: $8.890,35\pm868,20$ cel/mm³ para $7.947,64\pm1.445,83$ cel/mm³, p=643; PCI-L: $9.061,35\pm654,23$ cel/mm³ para $5.982,92\pm708,63$ cel/mm³, p=0,006; PCI-R: $8.477,92\pm732,55$ cel/mm³ para $6.891,78\pm646,58$ cel/mm³, p=0,148).

Ao final do experimento não houve diferença entre os grupos nos valores percentuais (p=0,647) e absolutos (p=0,216).

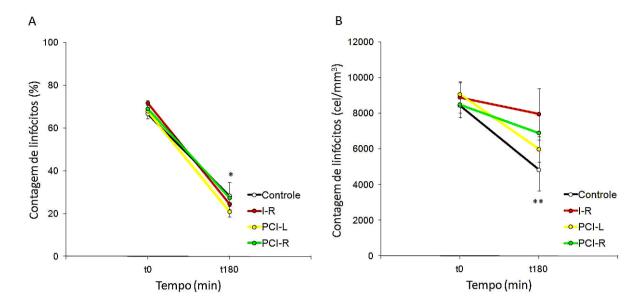


Figura 30: Variação da contagem de linfócitos durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm³). (*)p<0,05 vs. t0, (**) p<0,03 controle e PCI-L vs. t0.

Contagem de eosinófilos

A figura 31 ilustra os valores percentuais e sua tradução em valores absolutos da contagem eosinófilos (média ± EP) por grupo. Os valores individuais absolutos e percentuais de linfócitos são apresentados em Anexos – Tabela 17.

Não houve diferença entre os grupos no momento basal em valores percentuais (p=0,259) ou absolutos (p=0,412).

Em todos os grupos houve alteração significativa no número de eosinófilos no término do experimento em valores percentuais (Controle: 0,28±0,18% para 0,42±0,20%, p=0,689; I-R: 0,42±0,20% para 0,14±0,14%, p=172; PCI-L: 0±0% para 0,28±0,18%, p=172; PCI-R: 0,14±0,14% para 0±0, p=356), ou em valores absolutos (Controle: 32,42±21,99 cel/mm³ para 78,71±37,72 cel/mm³, p=0,412; I-R: 46,21±21,99 cel/mm³ para 48,21±48,21 cel/mm³, p=0,963; PCI-L: 0±0

cel/mm³ para 65,71±42,74 cel/mm³, p=0,175; PCI-R: 23,42±23,42 cel/mm³ para 0±0 cel/mm³, p=0,356)

Ao final do experimento não houve diferença entre os grupos nos valores percentuais (p=0,259) e absolutos (p=0,479).

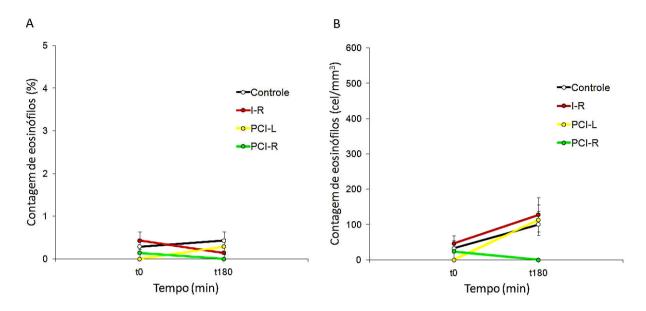


Figura 31: Variação da contagem de eosinófilos durante o experimento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. A: contagem percentual (%), B: contagem absoluta (cel/mm³).

4.4 Microscopia intra-vital

O estudo *in-vivo* da microcirculação foi realizado em preparação mesentérica avaliandose as interações leucócito-endotélio. A figura 31 mostra imagens representativas dos grupos experimentais para os parâmetros descritos adiante nesta seção.

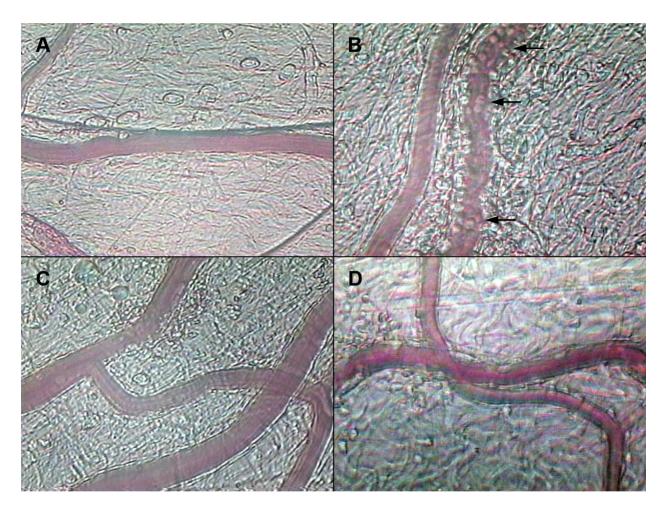


Figura 32: Fotomicrografia *in-vivo* da microcirculação mesentérica, nos grupos (A) controle, (B) isquemia e reperfusão (I-R), (C) precondicionamento isquêmico local (PCI-L), (D) precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R), em aumento de 425x. No grupo I-R evidenciase um maior número de leucócitos sobre a superfície venular (B - setas).

4.4.1 Diâmetros dos vasos

A figura 33 ilustra os diâmetros arteriolares e venulares do mesentério (média ± EP), por grupo. Os valores individuais destes diâmetros são apresentados em Anexos – Tabela 18.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos diâmetros das vênulas avaliadas (Controle: $17,52\pm0,59$; I-R: $17,99\pm0,71$; PCI-L: $19,47\pm0,59$; PIC-R: $18,78\pm0,96$, p=0,275) e das arteríolas adjacentes (Controle: $11,84\pm0,81$; I-R: $11,55\pm0,75$; PCI-L: $12,77\pm1,39$; PCI-R: $13,31\pm1,19$, p=0,633).

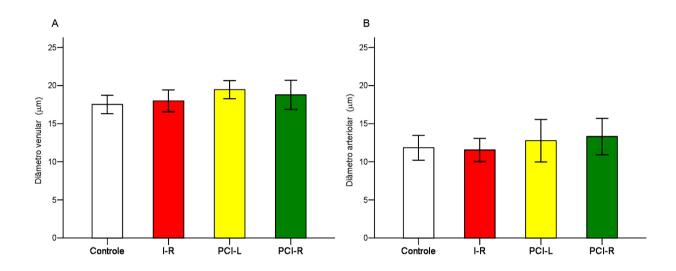


Figura 33: Diâmetro venular (A) e arteriolar (B) nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo.

4.4.2 Leucócitos em rolamento

A figura 34 ilustra número de leucócitos em rolamento na superfície endotelial (média ± EP), por grupo. Os valores individuais são apresentados em Anexos – Tabela 18.

Comparado ao grupo controle (119,14±3,90) houve um aumento significativo no número de leucócitos em rolamento nos grupos I-R (250,10±11,85, p<0,001), PCI-L (208,63±5,83, p<0,001) e PCI-R (197,21±11,62, p=0,002). No grupo PCI-R foi observado uma diminuição significativa no número de leucócitos em rolamento, comparada ou grupo I-R (p=0,046).

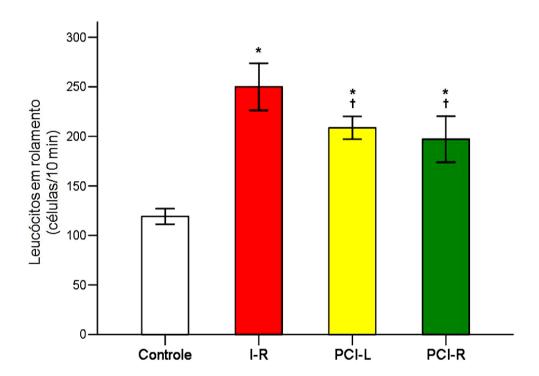


Figura 34: Número de leucócitos em rolamento nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p≤0,002 vs. controle (†)p=0,046 vs. I-R.

4.4.3 Velocidade de rolamento dos leucócitos

A figura 35 ilustra a velocidade de rolamento leucocitário na superfície venular em μ m/s (média \pm EP), por grupo. Os valores individuais são apresentados em Anexos — Tabela 18.

Comparado ao grupo controle (97,58 \pm 9,77 μ m/s), foi observado uma redução significativa na velocidade de rolamento leucocitário nos grupos I-R (47,14 \pm 6,45 μ m/s, p<0,008), PCI-L (57,82 \pm 3,59 μ m/s, p<0,033) e PCI-R (53,02 \pm 1,84 μ m/s, p<0,021).

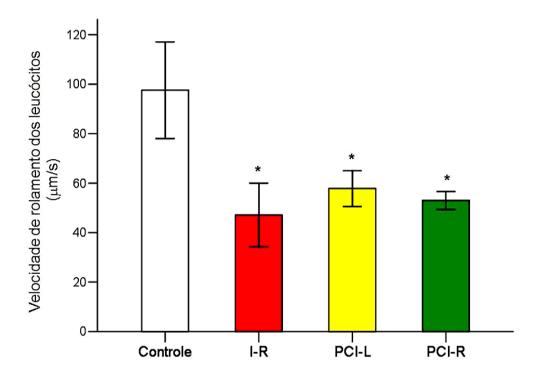


Figura 35: Velocidade de rolamento leucocitário nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p≤0,002 vs. controle.

4.4.4 Leucócitos aderidos

A figura 36 ilustra número de leucócitos aderidos à superfície endotelial em 100 μ m de extensão venular (média \pm EP), por grupo. Os valores individuais são apresentados em Anexos - Tabela 18.

Comparado ao grupo controle (3,59 \pm 0,38), foi observado um aumento significativo no número de leucócitos aderidos nos grupos I-R (19,20 \pm 0,55, p<0,001), PCI-L (15,63 \pm 0,60, p<0,001) e PCI-R (15,26 \pm 0,85, p<0,001). Nos grupos PCI-L e PCI-R este aumento foi significativamente inferior (p \leq 0,002) ao grupo I-R.

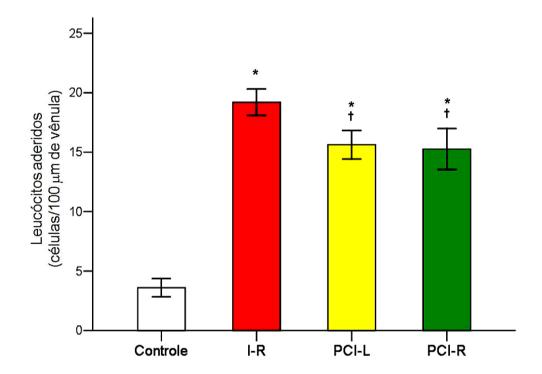


Figura 36: Número de leucócitos aderidos nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle (†)p≤0,002 vs. I-R.

4.4.5 Leucócitos migrados

A figura 37 ilustra número de leucócitos migrados para o espaço perivascular em 5.000 μm^2 (média \pm EP), por grupo. Os valores individuais são apresentados em Anexos – Tabela 18.

Comparado ao grupo controle $(3,67\pm0,29)$, foi observado um aumento significativo no número de leucócitos aderidos nos grupos I-R $(19,95\pm0,78,~p<0,001)$, PCI-L $(14,92\pm0,38,~p<0,001)$ e PCI-R $(14,57\pm0,78,~p<0,001)$. Nos grupos PCI-L e PCI-R este aumento foi significativamente inferior (p<0,001) ao grupo I-R.

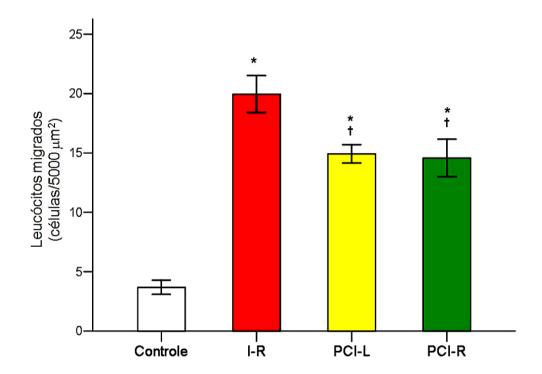


Figura 37: Número de leucócitos migrados nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle (†)p<0,001 vs. I-R.

4.5 Imuno-histoquímica

4.5.1 P-selectina

A figura 38 ilustra a expressão de P-selectina (média ± EP) em intensidade da fluorescência, por grupo. A figura 38 mostra imagens representativas dos grupos experimentais. Os valores individuais são apresentados em Anexos – Tabela 19.

Comparado ao grupo controle (2,841±0,364), foi observado um aumento significativo na expressão de P-selectina no grupo I-R (5,435±0,688, p<0,015). Nos grupos PCI-L (1,443±0,193) e PCI-R (1,327±0,099) houve uma diminuição destes valores de forma significativa quando comparada ao grupo I-R (p<0,001) e também ao grupo controle (p=0,003 vs. PCI-L; e p=0,012 vs. PCI-R).

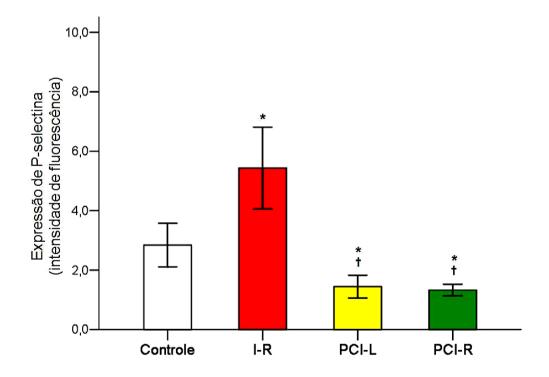


Figura 38: Expressão de P-selectina por grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle (†)p<0,001 vs. I-R

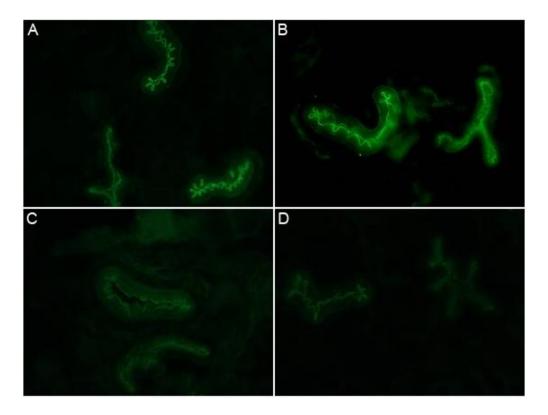


Figura 39: Fotomicrografia do mesentério mostrando detecção de P-selectina por imunofluorescência nos grupos (A) controle, (B) isquemia e reperfusão (I-R), (C) precondicionamento isquêmico local (PCI-L) e (D) precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R), em aumento de 1000x.

4.5.2 E-selectina

A figura 39 ilustra a expressão de E-selectina (média ± EP) em intensidade da fluorescência, por grupo. A figura 40 mostra imagens representativas dos grupos experimentais. Os valores individuais são apresentados em Anexos – Tabela 20.

Comparado ao grupo controle $(2,617\pm0,388)$, foi observado um aumento significativo na expressão de E-selectina no grupo I-R $(6,86\pm1,012, p<0,009)$. Os valores dos grupos PCI-L $(2,093\pm0,162)$ e PCI-R $(1,901\pm0,163)$ foram semelhantes ao grupo controle, e significativamente inferiores ao grupo I-R (p=0,004 vs. PCI-R; e p=0,003 vs. PCI-R).

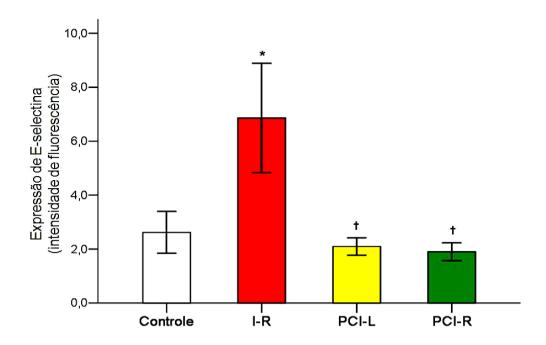


Figura 40: Expressão de E-selectina nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,01 vs. controle (†)p<0,005 vs. I-R.

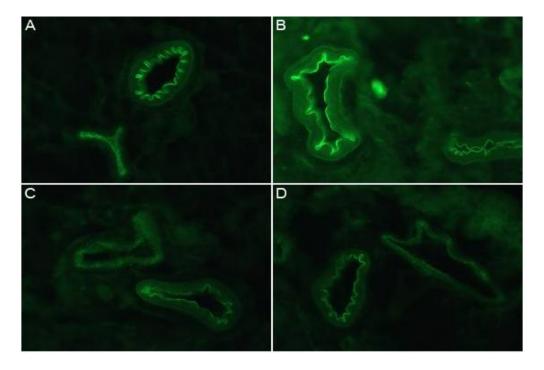


Figura 41: Fotomicrografia do mesentério mostrando detecção de E-selectina por imunofluorescência nos grupos (A) controle, (B) isquemia e reperfusão (I-R), (C) precondicionamento isquêmico local (PCI-L) e (D) precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R), em aumento de 1000x.

4.5.3 ICAM-1

A figura 42 ilustra a expressão de ICAM-1 (média ± EP) em intensidade da fluorescência, por grupo. A figura 42 mostra imagens representativas dos grupos experimentais. Os valores individuais são apresentados em Anexos – Tabela 21.

Comparado ao grupo controle $(2,534\pm0,281)$, foi observado um aumento significativo na expressão de ICAM-1 no grupo I-R $(7,749\pm0,909, p<0,001)$. Os valores dos grupos PCI-L $(3,850\pm0,444)$ e PCI-R $(2,087\pm0,356)$ foram semelhantes ao grupo controle, e significativamente inferiores ao grupo I-R (p=0,004 vs. PCI-R; e p<0,001 vs. PCI-R). A expressão de ICAM-1 no grupo PCI-R foi significativamente inferior ao grupo PCI-L. (p=0,022).

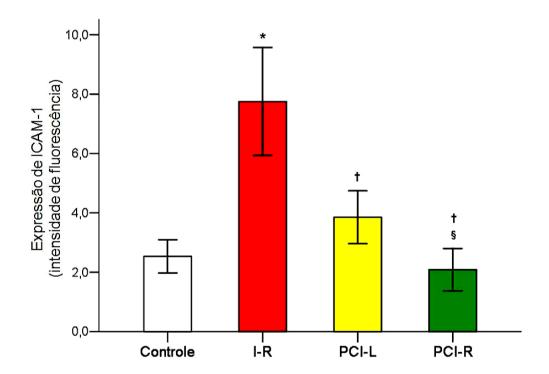


Figura 42: Expressão de ICAM-1 nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,01 vs. controle (†)p<0,005 vs. I-R (§)p=0,022 vs. PCI-L.

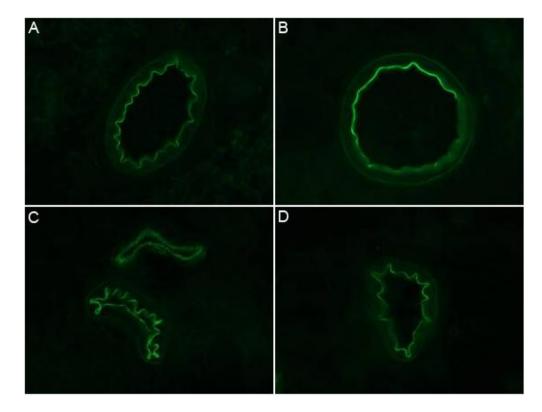


Figura 43: Fotomicrografia do mesentério mostrando detecção de ICAM-1 por imunofluorescência nos grupos (A) controle, (B) isquemia e reperfusão (I-R), (C) precondicionamento isquêmico local (PCI-L) e (D) precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R), em aumento de 1000x.

4.6 Histopatologia intestinal

A avaliação morfométrica do intestino delgado foi realizada tendo como parâmetros a espessura total da mucosa, a altura da vilosidade, a profundidade da cripta e a relação entre a altura da vilosidade e a profundidade da cripta. A figura 43 mostra imagens representativas dos grupos experimentais para os parâmetros descritos adiante nesta seção.

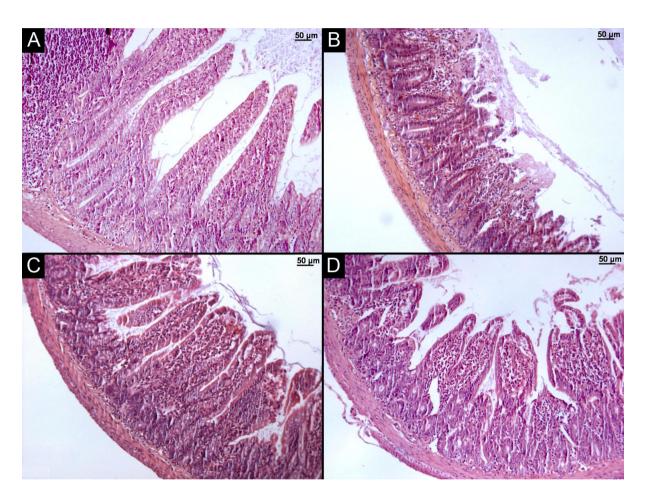


Figura 44: Fotomicrografia do intestino delgado nos grupos (A) controle, (B) isquemia e reperfusão (I-R), (C) precondicionamento isquêmico local (PCI-L), (D) precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Hematoxilina-eosina, em aumento de 100x.

4.6.1 Espessura total da mucosa

A figura 45 ilustra a espessura total da mucosa em μm (média ± EP), por grupo. Os valores individuais desta variável são apresentados em Anexos – Tabela 22.

Comparado ao grupo controle (528,01 \pm 24,17 μ m), houve uma diminuição significativa na espessura da mucosa no grupo I-R (244,52 \pm 14,54 μ m, p<0,001), mas não nos grupos PCI-L (475,56 \pm 27,95 μ m, p=0,342) e PCI-R (455,16 \pm 17,60 μ m, p=0,110). Não houve diferença entre os grupos PCI-L e PCI-R (p=0,910), mantendo-se estes valores significativamente maiores que o grupo I-R (ambos, p<0,001).

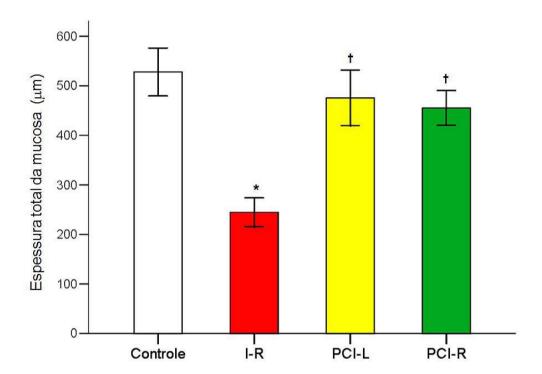


Figura 45: Espessura total da mucosa (μ m) nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média \pm EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle, (†)p<0,001 vs. I-R.

4.6.2 Altura da vilosidade

A figura 46 ilustra a altura das vilosidades intestinais em μm (média ± EP), por grupo. Os valores individuais desta variável são apresentados em Anexos – Tabela 22.

Comparado ao grupo controle (346,60 \pm 18,83 μ m), houve uma diminuição significativa na altura da vilosidade nos grupos I-R (106,13 \pm 6,94 μ m, p<0,001) e também nos grupos PCI-L (275,17 \pm 18,93 μ m, p=0,013) e PCI-R (266,68 \pm 12,26 μ m, p=0,005). Não houve diferença entre os grupos PCI-L e PCI-R (p=0,978), mantendo-se estes valores significativamente maiores que o grupo I-R (ambos, p<0,001).

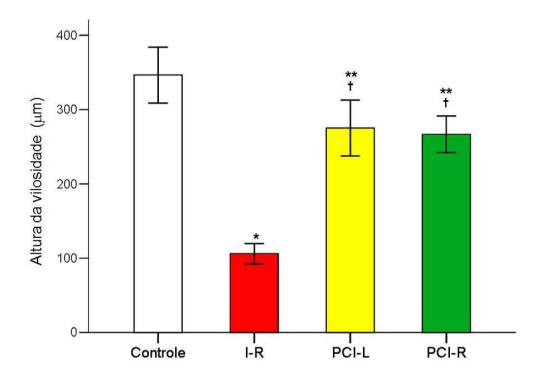


Figura 46: Altura da vilosidade (μ m) nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média \pm EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle, (**)p<0,002 vs. controle (†)p<0,001 vs. I-R.

4.6.3 Profundidade da cripta

A figura 47 ilustra a profundidade das criptas intestinais em μ m (média \pm EP), por grupo. Os valores individuais desta variável são apresentados em Anexos – Tabela 22.

Comparado ao grupo controle (184,60 \pm 10,40 μ m), houve uma diminuição significativa na profundidade da cripta no grupo I-R (111,40 \pm 6,22 μ m, p<0,001), mas não nos grupos PCI-L (172,09 \pm 7,61 μ m, p=0,712) e PCI-R (183,26 \pm 8,33 μ m, p=0,999). Não houve diferença entre os grupos PCI-L e PCI-R (p=0,776), mantendo-se estes valores significativamente maiores que o grupo I-R (ambos, p<0,001).

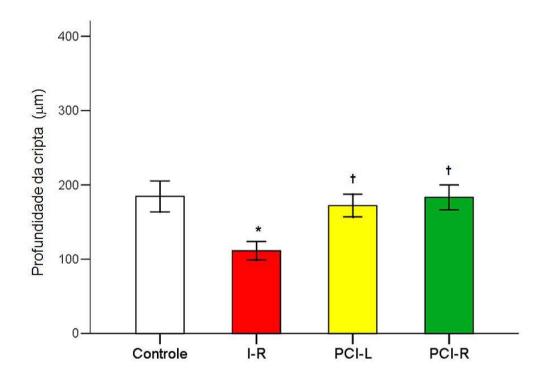


Figura 47: Profundidade da cripta (μm) nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle, (†)p<0,001 vs. I-R.

4.6.4 Relação altura da vilosidade / profundidade da cripta

A figura 48 ilustra a relação entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais (média ± EP), por grupo. Os valores individuais desta variável são apresentados em Anexos – Tabela 22.

Comparado ao grupo controle (1,88 \pm 0,61), houve uma diminuição significativa na relação altura da vilosidade / profundidade da cripta no grupo I-R (0,95 \pm 0,50, p<0,001), e também nos grupos PCI-L (1,60 \pm 0,94, p=0,013) e PCI-R (1,46 \pm 0,56, p=0,001). Não houve diferença entre os grupos PCI-L e PCI-R (p=0,460), mantendo-se estes valores significativamente maiores que o grupo I-R (ambos, p<0,001).

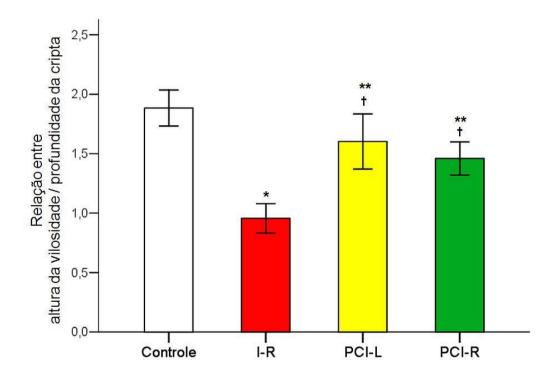


Figura 48: Relação altura da vilosidade / profundidade da cripta nos grupos controle, isquemia e reperfusão (I-R), precondicionamento isquêmico local (PCI-L), precondicionamento isquêmico remoto (PCI-R). Dados expressos como média ± EP de 7 animais por grupo. (*)p<0,001 vs. controle, (**)p<0,05 vs. controle (†)p<0,001 vs. I-R.

4.7 Mortalidade do experimento

Houve 5 óbitos (9%) durante a realização do experimento. Estes animais foram substituídos e os procedimentos repetidos para que se mantivesse o número total de 14 animais por grupo.

Dois óbitos ocorreram durante a preparação experimental por lesão de veia cava inferior durante a dissecção e reparo da aorta infrarrenal, um no grupo I-R e outro no grupo PCI-R.

Três animais morreram durante a observação microscópica intravital. O primeiro, pertencente ao grupo controle, foi a óbito por arrancamento do cateter intra-arterial devido à movimentação brusca do animal após superficialização do plano anestésico, levando a perda sanguínea não controlada. Outros dois animais, um do grupo controle e outro do grupo PCI-L, foram a óbito após dose adicional exagerada de anestésico, causando depressão cardiorrespiratória.



5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo nos permitem sugerir que o PCI local ou remoto é capaz de modular as interações leucócito-endotélio que se desenvolvem na microcirculação mesentérica devido à lesão I/R causada pelo pinçamento aórtico supracelíaco.

A questão clínica central desta investigação está relacionada à elevada morbidade e mortalidade associada ao reparo de doenças complexas da aorta toracoabdominal que necessitam a oclusão temporária de fluxo aos ramos viscerais. 41-44 O pinçamento e despinçamento da aorta supracelíaca leva a alterações fisiopatológicas nos tecidos submetidos à I/R, 112 mas que são amplificadas a outros órgãos e sistemas num processo de disfunção endotelial e inflamação sistêmica, que pode resultar na falência de múltiplos órgãos e óbito. 58

A oclusão da aorta supracelíaca causa variações intensas e abruptas sob o ponto de vista hemodinâmico. As alterações mais nítidas e invariavelmente presentes são um aumento da resistência vascular periférica e aumento da pressão arterial média. Já a liberação da aorta é acompanhada de diminuição importante destes mesmos parâmetros a valores tipicamente inferiores ao momento anterior à oclusão. O fenômeno conhecido como hiperemia reativa é uma das principais respostas ao reestabelecimento do fluxo sangüíneo aos territórios isquêmicos. Ele corresponde a um aumento de fluxo nos tecidos submetidos previamente à isquemia devido a uma diminuição do tônus vasomotor, causado pela hipóxia tecidual, pelo acúmulo catabólico de vasodilatadores e também por uma resposta miogênica direta. Estas alterações causam uma importante redistribuição do volume intravascular, que é uma das causas fundamentais da hipotensão do despinçamento aórtico. 113

Em nosso estudo observamos que o pinçamento aórtico supracelíaco resultou em um aumento significativo da PAM em todos os grupos e tempos cirúrgicos previstos no protocolo experimental. O despinçamento causou uma queda significativa da PAM a valores

inferiores aos basais e aos momentos prévios ao pinçamento. Quando foi realizado por curtos períodos como manobra de PCI local, o restabelecimento da PAM ocorreu de forma espontânea e imediata. Já o despinçamento supracelíaco após a isquemia prolongada produziu uma hipotensão sustentada, que foi manejada com expansão volêmica. Evidências clínicas demonstram que a reposição volêmica prévia a reperfusão, mantendo pressões de enchimento cardíaco mais elevadas, previne a hipotensão do despinçamento em pacientes submetidos à correção cirúrgica do AAA.¹¹⁴

Diferentemente, o pinçamento aórtico infrarrenal utilizado como manobra de PCI remoto não causou variações significativas da PAM. Embora a PAM não se encontrasse elevada, o dispinçamento neste nível causou uma discreta mas significativa queda pressórica. Estes dados estão de acordo com observações clínicas que mostram variações hemodinâmicas significativas com oclusão aórtica supracelíaca, mas não com a oclusão infrarrenal.¹¹⁵

Neste estudo procuramos desenvolver um modelo que simulasse um procedimento de reconstrução da aorta toracoabdominal com pinçamento da aorta supracelíaca. O modelo aqui empregado foi derivado de alguns testes pilotos antes do estabelecimento do protocolo final deste estudo. Observamos que, com um tempo de pinçamento da aorta supracelíaco por mais de 25 minutos, havia uma piora hemodinâmica progressiva e óbito a partir de 40 a 60 minutos de reperfusão. Chegamos então ao entendimento que 20 minutos de isquemia produziria uma lesão importante, mas ainda mantendo os animais de experimentação em condições de suportar a lesão da reperfusão nas duas horas subseqüentes.

Poucas investigações experimentais sobre a lesão de I/R causada pelo pinçamento da aorta supracelíaca são encontradas na literatura. Avaliando o papel do TNF- α e IL-1 no infiltrado neutrofílico pulmonar causado pelo pinçamento da aorta supracelíaca, alguns autores utilizaram 30 minutos de isquemia seguido de duas horas de reperfusão. Este mesmo grupo posteriormente estudou o papel antiinflamatóirio da IL-10 neste mesmo modelo, mas reduzindo o tempo de isquemia para 20 minutos, a semelhança de nosso experimento. Diferentemente, outro estudo descreveu, sem testar intervenções terapêuticas, a lesão pulmonar causada pelo pinçamento da aorta supracelíaca por 40

minutos. No entanto, este protocolo experimental previu apenas uma hora de reperfusão, com a coleta de amostras ao final deste curto período. 116

Os estudos sobre os efeitos do PCI são usualmente focados em órgãos isolados. A maior parte concentra-se sobre o coração, com oclusões de artérias coronárias para estudo do tecido miocárdico. Estudos em território esplâncnico também têm sido conduzidos desta maneira, com oclusão da artéria hepática para avaliação hepática, 104 e da artéria mesentérica superior (AMS) para avaliação intestinal. 117 Mas mesmo desta forma, em órgãos isolados, existe uma grande variabilidade de protocolos empregados para avaliar o PCI. Uma das diferenças mais significativas destes modelos é a diversidade quanto à duração e ao número de ciclos de I/R utilizados como PCI.

No miocárdio, estas variações vão desde um ciclo de 1,25 a 15 minutos de isquemia, 118, 119 até cinco ciclos de 5 minutos de isquemia e de reperfusão. 120 Segundo alguns autores, os protocolos atualmente mais aceitos para o miocárdio variam de um a dois ciclos de 5 minutos de isquemia, intercalados por 5 a 10 minutos de reperfusão. 121

Para avaliar os efeitos do PCI no fígado, existe uma tendência em utilizar um ciclo de 10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão, 104, 122 embora não sejam infreqüentes outros modelos, como 5 minutos de isquemia e 10 de reperfusão em um 123 ou dois ciclos. 124 Para o intestino delgado, um dos órgãos mais sensíveis à lesão de I/R, existe maior variabilidade de protocolos de IPC, como aplicar de 1 a 4 ciclos de isquemia com duração entre 1 a 20 minutos e reperfusão entre 5 a 10 minutos. 117, 125

Quanto ao PCI remoto também não há definições sobre os tempos de isquemia e reperfusão mais adequados. Novamente, a grande parte das publicações estuda a proteção miocárdica conferida pelo precondicionamento em órgãos distantes como intestino, rim e músculo esquelético. Nestes modelos, o estímulo precondicionante varia de um a seis ciclos de I/R com duração de 4 a 15 minutos de isquemia e 4 a 10 minutos de reperfusão. 126, 127 Um estudo avaliou o PCI remoto para proteção cardíaca com oclusão temporária da aorta infrarrenal por 5, 10 ou 15 minutos, sendo obtidos melhores resultados com o ciclo mais prolongado. No entanto, estes achados não trouxeram consenso à literatura, com a utilização rotineira de modelos com mais de um ciclo de isquemia e reperfusão por períodos de tempos menores, como 5 a 10 minutos. 129-131

Para o modelo empregado neste estudo, procuramos respeitar os protocolos mais frequentemente utilizados na literatura e a suscetibilidade de cada tecido à lesão de I/R. Desta forma, para o PCI local que envolveu a oclusão de fluxo para o fígado e intestino utilizamos dois ciclos com 5 minutos de isquemia e 5 minutos de reperfusão. Já para o PCI remoto que levou à oclusão de fluxo basicamente para a musculatura estriada utilizamos dois ciclos de 10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão.

Assim, considerando a grande variabilidade de protocolos empregados na investigação da lesão de I/R e do PCI em diversos territórios isolados, e a necessidade da criação de um modelo para investigação do PCI no pinçamento aórtico supracelíaco, procuramos determinar em nosso experimento as alterações comumente encontradas em exames laboratoriais e as modificações histopatológicas no intestino delgado.

As alterações de gasometria arterial foram bastante descritas no pinçamento aórtico. Os achados mais proeminentes são uma acidose metabólica e aumento nas concentrações de lactato. $^{113,\ 132,\ 133}$ Em nosso experimento, todos os animais submetidos ao pinçamento aórtico supracelíaco apresentaram queda no pH com consumo excessivo de bases, não compensado apesar dos esforços ventilatórios representados por uma queda na pCO₂ e aumento da pO₂, o que está de acordo com outras investigações sobre as variações hemodinâmicas e metabólicas no pinçamento aórtico supracelíaco. $^{134,\ 135}$

Quanto à avaliação hematológica, o número total leucócitos circulantes em sangue periférico mais que dobrou nos grupos submetidos ao pinçamento aórtico. A contagem diferencial mostrou que a leucocitose ocorreu devido a um aumento de neutrófilos, de forma mais nítida no grupo não precondicionado. Observações em humanos submetidos ao pinçamento de aorta mostram variações semelhantes do leucograma nesta condição. ¹³⁶ Já as alterações do hematócrito nos possibilitam fazer algumas inferências sobre as alterações de permeabilidade vascular após o período de I/R, que são responsáveis por causar um extravasamento de líquido do compartimento intravascular para o espaço intersticial. ⁶⁰ Apesar da reposição volêmica para estabilização da PAM, apenas os animais no grupo controle mantiveram hematócrito inalterado. Nos demais grupos onde foi realizado o pinçamento aórtico houve uma hemoconcentração, novamente, de forma mais relevante no grupo não precondicionado.

Entre os diversos órgãos submetidos à I/R multivisceral, o intestino é reconhecido como um dos tecidos mais sensíveis a esta agressão. ¹³⁷ Algumas considerações anatômicas e fisiopatológicas ajudam a entender esta suscetibilidade da mucosa intestinal, em especial da vilosidade. O suprimento sanguíneo para a vilosidade intestinal é feito por uma arteríola central que dista menos de 20µm da rede de capilares e vênulas que drenam esta região. Esta proximidade facilita a difusão de diversas moléculas, dentre elas o oxigênio, colaborando com um mecanismo de contracorrente na base da vilosidade mesmo em condições fisiológicas. Em situações de hipoperfusão esplâncnica, como é o caso do pinçamento aórtico supracelíaco, o fluxo sanguíneo lentificado permite um maior tempo para o equilíbrio de difusão, levando a um curto circuito que reduz ainda mais a pressão parcial de oxigênio na extremidade distal da vilosidade. ¹³⁸

Alterações morfológicas graves na mucosa intestinal têm sido demostradas após a lesão de I/R, bem como a capacidade do PCI em reduzir esta agressão em modelos de oclusão da AMS. 106, 139, 140 Embora existam avaliações qualitativas com escalas de lesão intestinal empregando sistemas de pontuação como a de Chiu 141 ou a de Park 142 utilizamos a avaliação quantitativa das imagens processadas em um sistema digital de medidas, com parâmetros objetivos utilizados na literatura para lesão intestinal. 143

A análise morfométrica da mucosa intestinal mostrou que no grupo submetido somente ao pinçamento aórtico prolongado a espessura total da mucosa foi reduzida a menos que a metade do grupo controle. Embora a profundidade da cripta também tenha sido diminuída neste grupo, o principal responsável pela queda da espessura da mucosa foi a perda da altura da vilosidade, mais de três vezes inferior ao grupo controle, o que se reflete na redução pela metade da relação entre a altura da vilosidade e profundidade da cripta.

Já nos grupos com PCI local ou remoto a espessura total da mucosa e a profundidade da cripta se mantiveram semelhantes ao grupo controle. Apenas a altura da vilosidade foi reduzida, mas ainda assim mantendo-se mais que o dobro do grupo não precondicionado. Portanto, neste modelo de oclusão aórtica supracelíaca, a lesão de I/R na mucosa intestinal foi atenuada pelo PCI local ou remoto, fazendo-se notar apenas na vilosidade intestinal, segmento da mucosa mais sensível a situações de baixo fluxo sanguíneo.

Alguns parâmetros laboratoriais como lactato¹⁰⁶ e mais comumente DHL^{144, 145} se correlacionam com a análise histológica, e são utilizados como marcadores da lesão intestinal. Em nosso estudo, os níveis de lactato arterial obtidos ao final do experimento encontravam-se elevados nos grupos submetidos à lesão de I/R, e o PCI local ou remoto diminuiu estas concentrações. Tendência semelhante foi identificada nos níveis de DHL, mas somente no grupo com o PCI remoto a redução de DHL foi significativa.

Um importante estudo sobre os efeitos do PCI local na lesão de I/R intestinal avaliou a perfusão microvascular com fluxômetro laser doppler. Foi demonstrado que no grupo não precondicionado a perfusão tecidual mantinha-se diminuída mesmo no período de reperfusão. Já no grupo submetido ao PCI, a perfusão tecidual retornou a valores próximos ao grupo controle. Segundo estes autores, a modulação do fluxo na microcirculação foi uma das conseqüências imediatas do PCI, preservando o fluxo ao nível de capilares e vênulas pós-capilares, locais primariamente implicados na falência microcirculatória induzida pela I/R. Mensurações de fluxo na AMS confirmam estes de que a reperfusão não restabelece a fluxo sanguíneo aos valores basais anteriores à isquemia. 147

A disfunção microvascular resulta de uma série de eventos que envolvem a interação de células sanguíneas com as células endoteliais. Diversas alterações celulares que ocorrem na lesão de I/R como a depleção de reservas de energia, a alteração do equilíbrio iônico, a redução ou o aumento da produção de substâncias bioativas são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos que irão conduzir à lesão microvascular e também parenquimatosa. 148, 149

O papel dos leucócitos como mediadores da disfunção microvascular causada pela lesão de I/R ficou evidente a partir de estudos que demonstraram o acúmulo de neutrófilos em tecidos reperfundidos e a redução da lesão tecidual em animais neutropênicos tratados com antisoro contra neutrófilos. 150-152

Experimentos com a utilização de anticorpos monoclonais contra moléculas de adesão consolidaram o reconhecimento das interações leucócito-endotélio como o processo chave na lesão de I/R. Mais ainda, o uso seletivo de anticorpos contra diferentes ligantes presentes da superfície de leucócitos, em observações *in-vivo* da microcirculação mesentérica, evidenciou que o processo de recrutamento leucocitário possui suas diferentes

etapas mediadas por moléculas distintas. Estudos pioneiros mostrando, por exemplo, que o bloquieo da L-seletina inibe o rolamento leucocitário, enquanto o bloqueio de moléculas da família das β 2-integrinas (CD11/CD18) não evita este comportamento, mas impede a firme adesão ao endotélio venular, ajudaram a construir o modelo de recrutamento leucocitário amplamente aceito na atualidade. 154

Embora esta alteração no comportamento dos neutrófilos simbolize o processo inflamatório da lesão de I/R, ela só ocorre por modificações também nas células endoteliais, em especial das vênulas pós-capilares, com alterações fenotípicas importantes que incluem uma superfície vascular pró-adesiva para o recrutamento de leucócitos circulantes. Mesmo reconhecendo que a menor força de arraste do fluxo sanguíneo neste local da microcirculação predisponha às interações leucócito-endotélio, 155 este componente hemodinâmico isoladamente não determina a ocorrência deste fenômeno, uma vez que manipulações na perfusão da microcirculação mesentérica, com grandes variações da velocidade de fluxo sanguíneo em arteríolas e vênulas, não é capaz de promover o rolamento e adesão de leucócitos ao longo da superfície endotelial das arteríolas. Mas a força de arraste do fluxo sanguíneo reduzida nos tecidos pós-isquêmicos inflamados possui um papel permissivo importante em permitir maior adesão de neutrófilos a superfície venular. 157

O aumento da expressão endotelial de antígenos de superfície, ou o aumento da avidez por seus ligantes, são os principais elementos responsáveis pela mediação das diferentes etapas do recrutameto leucocitário. Dentro deste paradigma, as P- e E-selectinas estão envolvidas na primeira etapa de rolamento leucocitário, evidenciada em estudos *in-vitro* com a cultura de células endoteliais bem como estudos *in-vivo* com a microscopia intravital. A firme adesão dos leucócitos e a emigração para os tecidos adjacentes ocorre devido a expressão de moléculas de adesão da família das imunoglobulinas, com destaque para o papel da ICAM-1, novamente em estudos *in-vitro* in-vivo. In-

Em nosso experimento, identificamos que o comportamento leucocitário *in-vivo* foi bastante afetado pela isquemia prolongada do pinçamento aórtico supracelíaco. Comparado ao grupo controle o número de leucócitos em rolamento duplicou e a velocidade deste

rolamento sobre a superfície endotelial caiu pela metade. Outras alterações relevantes foram o aumento no número de leucócitos aderidos e migrados, ambos com valores mais de cinco vezes acima dos registrados no grupo controle. Estudos prévios sobre a microcirculação mesentérica mostraram que estas modificações no comportamento leucocitário são observadas com a oclusão temporária da AMS, levando a um aumento do rolamento leucocitário com velocidades diminuídas e aumento da adesão e migração leucocitária. 66, 67, 166

Nos animais do grupo I-R observamos que a expressão de P- e E-selectina foi em torno de duas vezes maior que o controle. Estudos, novamente com a lesão de I/R causada pela oclusão temporária da AMS, também mostraram a elevação de P-selectina¹⁶⁷ e E-selectina. Embora essas moléculas aparentemente tenham funções sobreponíveis no rolamento leucocitário, alguns estudos sugerem atuações distintas. Investigações iniciais mostraram que a P-selectina teria a função predominante no rolamento leucocitário, om atividade precoce após o estímulo inflamatório, enquanto que a E-selectina teria ação no rolamento leucocitário após uma hora ou mais do estímulo inflamatório. Outros estudos indicaram que a E-selectina estaria implicada na diminuição da velocidade de rolamento dos leucócitos, sendo este precesso de lentificação necessário para a firme adesão subseqüente.

Ainda neste grupo sem o PCI, a expressão de ICAM-1 foi três vezes maior que o grupo controle. Este achado, associado ao grande aumento no número de leucócitos aderidos e migrados neste grupo, reforça as conclusões de um estudo clássico que realizou o bloqueio de diferentes moléculas de adesão demostrando que a disfunção microvascular, com extravasamento de albumina para o interstício, está fortemente associada à adesão e à migração leucocitárias mediadas pela interação do complexo CD11b/CD18 dos neutrófilos com o ICAM-1 das vênulas pós-capilares.⁶⁶

Desta forma, identificamos em nosso experimento que o pinçamento da aorta supracelíaca induziu alterações na expressão de moléculas de adesão no endotélio que atuam em diferentes etapas do recrutamento leucocitário, produzindo modificações intensas no comportamento leucocitário observado *in-vivo* na microcirculação mesentérica.

Já o PCI aplicado localmente ou à distância modulou estas interaçãos leucócito-

endotélio. Embora aparentemente o número de leucócitos em rolamento tenha diminuído com o PCI, esta tendência atingiu significado estatístico apenas nos animais com PCI remoto. As diferenças mais marcantes na comparação entre os dois grupos de PCI com o grupo I-R foram observadas quanto ao número de leucócitos aderidos e migrados, com reduções significativas em ambas as formas de PCI. Estudos com preparação de musculatura estriada evidenciaram que o PCI local é capaz de diminuir o número de leucócitos aderidos ou migrados. ¹⁷¹ Estas observações de menor aderência e migração com o PIC local foram depois confirmados em preparação mesentérica, mas semelhante aos nossos achados, o número de leucócitos em rolamento não foi menor com o PCI. ¹⁶⁶ Outros estudos com microscopia intravital em diferentes leitos vasculares têm mostrado que o PCI local reduz todas as etapas do recrutamento leucocitário na lesão de I/R, como é o caso dos sinusóides hepáticos ¹²³ e vênulas musculares. ¹⁷² Já informações sobre a modulação das interações leucócito-endotélio com o PCI remoto não são encontradas na literatura.

Quanto à expressão de moléculas de adesão no endotélio, o PCI local e remoto causou uma diminuição de E-selectina para valores equivalentes ao grupo controle, e de P-selectina para valores até inferiores a este grupo. Muito poucas publicações descrevem o efeito do PCI na expressão destas moléculas de adesão no mesentério. Em um estudo com quantificações feitas em alças de jejuno, o PCI local impediu a elevação de P-selectina ocorrida no grupo com o pinçamento prolongado da AMS. Mesmo com o concordância deste estudo aos nossos achados, deve-se ressaltar os possíveis efeitos da própria preparação cirúrgica com manipulação da aorta supracelíaca, à semelhança dos efeitos da exposição do mesentério para observação microscópica intravital. Estas manobras reconhecidamente podem produzir alguma inflamação evidenciada por um rolamento leucocitário basal, 174 e poderiam ser também responsáveis por uma expressão basal aumentada destas moléculas de adesão no grupo controle, o que facilitaria a equidade aos valores dos grupos com o PCI.

Seguindo a tendência das alterações nas selectinas, a expressão de ICAM-1 no mesentério também foi reduzida pelo o PIC local ou remoto. Já o achado de menor expressão de ICAM-1 no grupo com o PCI remoto comparado ao PCI local possui difícil avaliação, uma vez que o número de leucócitos aderidos e migrados foi semelhante nestes grupos. Também aqui, muito poucas investigações avaliaram o efeito do PCI sobre a

expressão de ICAM-1. Em estudo com cultura de células endoteliais da aorta com lesão induzida por anóxia e reoxigenação, o precondicionamento reduziu a expressão de ICAM-1,¹⁷⁵ embora seja difícil a comparação dos dados desta publicação com nosso estudo devido aos mecanismos distintos de lesão.

Assim, o PCI local e remoto como intervenções propostas para reduzir a disfunção microcirculatória foi capaz de normalizar a expressão de moléculas de adesão no endotélio e reduzindo a aderência dos leucócitos às vênulas pós-capilares e a migração dos leucócitos para os tecidos perivasculares.

Em revisão da literatura não encontramos paralelo aos achados principais de nosso experimento, que descreve as alterações microcirculatórias induzidas pela lesão de I/R causada pelo pinçamento da aorta supracelíaca e a redução destes danos com o PCI, em especial quando aplicado de forma remota devido às possíveis implicações clínicas. 176

Com a demonstração em diferentes modelos animais que o PCI é capaz de tornar os mais diversos tecidos resistentes à lesão de I/R, investigações em humanos têm sido publicadas com maior frequência estudando os efeitos desta intervenção tanto em indivíduos sadios como em doentes submetidos a tratamentos já estabelecidos.

Em um estudo com voluntários saudáveis foi avaliada a disfunção endotelial produzida por um período de I/R com a insuflação de manguito de pressão no membro superior não dominante. A resposta a 20 minutos de isquemia seguida de 60 minutos de reperfusão foi uma diminuição da vasodilatação dependente do endotélio e a ativação de neutrófilos com maior expressão do complexo CD11b/CD18. O PCI realizado localmente com três ciclos de 5 minutos de I/R, 30 minutos antes da isquemia prolongada, impediu a esta disfunção endotelial e ativação leucocitária. Em modelo semelhante, estes autores testaram o efeito do PCI realizado à distância no braço contralateral, mostrando que esta manobra também confere proteção à disfunção endotelial induzida pela I/R. 178

Dentre as vísceras abdominais que são submetidas à lesão de I/R pelo pinçamento aórtico supracelíaco, o fígado é um dos órgãos mais investigados. O estudo do PCI hepático tem despertado grande interesse, com pesquisas em humanos focadas na proteção contra a lesão de I/R causada pela exclusão vascular em ressecções hepáticas ou pelo transplante. Em

hepatectomias maiores com PCI, estudos randomizados mostraram haver menor pico de transaminases no pós-operatório imediato,^{179, 180} e também menor apoptose no fígado remanescente.¹⁸¹ No entanto, outras publicações não observaram esta proteção hepática,¹⁸² além de haver questionamentos por ainda não se conseguir demonstrar uma redução de desfechos clínicos de morbidade ou mortalidade com esta intervenção.

No transplante hepático os resultados de estudos randomizados com PCI possuem controvérsias semelhantes. Estudos iniciais não mostraram diferenças com ciclos de 5 minutos de PCI local antes da retirada do órgão. Aplicando o PCI local com 10 minutos de isquemia, outros autores observaram no pós-operatório imediato menores concentrações de transaminases, e menor grau de apoptose, sem diferenças na função do enxerto ou morbidade do procedimento. Também aqui existe relato contrário a estes resultados, com um estudo mostrando aumento dos níveis de transaminases, mas sem repercução clínica. 186

Em outros órgãos como o rim, onde foi demonstrado benefícios com o PCI em modelos animais, 187 não existem investigações relevantes em humanos, embora o rim seja um dos órgãos mais frequentemente transplantado e com taxas de disfunção primária relativamente altas. 188 Situação semelhante se identifica com o PCI no intestino. Diversos estudos mostraram a redução da lesão intestinal com o PCI em animais. 137 E mesmo havendo situações clínicas como a transposição de alças de jejuno e o transplante de intestino onde a lesão de I/R está presente, 189 não se identificam investigações em humanos.

O tecido cardíaco não sofre a lesão direta da I/R do pinçamento aórtico supracelíaco, mas a descrição dos efeitos do PCI no miocárdio é válida, pois é neste território que novamente se encontra a grande massa de conhecimento sobre o tema. De forma geral, os estudos em humanos sobre o PCI possuem algumas limitações por serem baseados quase sempre em desfechos substitutivos. Desta forma, as variáveis avaliadas no miocárdio costumam ser a ocorrência de angina, alterações isquêmicas no ECG ou arritmias, 190, 191 ao invés do padrão experimental que é a análise histopatológica da área de infarto. Duas intervenções foram as mais empregadas para o estudo do PCI: a angioplastia coronariana transluminal percutânea (ACTP) e a cirurgia de revascularização miocárdica (CRM).

A primeira oportunidade de avaliar o efeito do PCI local foi durante a ACTP.

Observações iniciais mostraram que pacientes submetidos à ACTP tiveram menores

alterações hemodinâmicas e eletrocardiográficas durante a segunda insuflação do balão de angioplastia, além de menos angina e menor produção miocárdica de lactato. ¹⁹⁰ Outros autores confirmaram estes achados clínicos, com a importante constatação que o prétratamento com glibenclamida, um hipoglicemiante oral que bloqueia seletivamente canais de K dependentes de ATP, aboliu o efeito do PCI. ¹⁹² Também foi observado que, além de menores alteraçõees do segmento ST e dor torácica, o PCI diminuiu arritmias ventriculares, com a demonstração que este efeito não foi causado por aumento de fluxo sanguíneo por recrutamento de colaterais. ¹⁹³

Outro cenário clínico importante para PCI é a CRM. A primeira publicação do efeito no miocárdio do PCI local sobre a lesão de I/R causada por CRM com circulação extracorpórea (CEC) em um grupo pequeno de pacientes mostrou que esta estratégia resultou em menor depleção de reservas de ATP em biópsia de miocárdio realizadas após o período de isquemia sustentada. Posteriormente este grupo testou esta hipótese em situação clínica semelhante verificando menor concentração sérica de troponina T no período pós-operatório. Ainda com este modelo, foi demonstrado que o PCI local foi superior ao precondicionamento farmacológico com agonista do receptor de adenosina A1, na redução da área de necrose. Outras publicações mostram que o PCI local melhorou a contratilidade ventricular em pacientes submetidos a CRM com CEC levando a menor necessidade de suporte inotrópico, de diminuindo a ocorrência de arritmias ventriculares pós-operatórias. Mesmo quando associado à hipotermia moderada de 32° C, o efeito benéfico do PCI na redução da lesão miocárdica manteve-se, com menor liberacão de troponina I ao longo de 72hs após a CRM. 198, 199

No entanto, o pinçamento da aorta ascendente utilizado como PCI local implica em riscos de embolização causando infarto cerebral perioperatório. Por este motivo possui aplicabilidade clínica limitada, particularmente em pacientes com idade avançada e calcificações aórticas significativas.

Com o conceito de proteção remota, abriu-se uma nova avenida de possibilidades clínicas. Testes iniciais com o PCI remoto aplicado com manguitos de pressão no braço direito previamente a CRM com CEC, levaram a resultados inconclusivos, provavelmente devido ao reduzido tamanho da amostra de quatro pacientes por grupo.²⁰⁰ Com o PCI

remoto induzido da mesma forma, um estudo randomizado mostrou que esta manobra reduziu a liberação de troponina T ao longo do período de 72 hs de pós-operatório de CRM.²⁰¹ Em um cenário um pouco diferente, o PCI remoto aplicado em crianças submetidas à correção de defeitos congênitos também minimizou o dano miocárdico, reduzindo a concentração de troponina I no pós-operatório.²⁰²

Recentemente foi publicado um estudo prospectivo com 242 pacientes consecutivos submetidos à ACTP eletiva randomizados para receber o PCI remoto com manguito no membro superior não dominante. Nos pacientes que receberam esta intervenção, houve uma redução no desfecho primário, com uma menor concentração de troponina I em 24hs após a intervenção, e também uma redução nos desfechos secundários, com menores taxas de eventos adversos coronários após seis meses da intervenção inicial.²⁰³

No contexto das operações vasculares maiores, um dos mais importantes estudos clínicos publicados sobre o PCI incluiu pacientes submetidos à correção aberta do AAA. Os autores incluíram 82 pacientes submetidos ao procedimento convencional randomizados para receber o PIC remoto através do pinçamento sequencial de cada uma das artérias ilíacas comuns por 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusão. Os principais achados deste estudo foram não só uma diminuição significativa na lesão miocárdica no grupo com o PCI, mas também uma menor incidência de infarto do miocárdio e disfunção renal, independente de outras variáveis. 204 Do ponto de vista prático, esta manobra de PCI remoto pode ser amplamente aplicada em humanos sem provocar complicações inerentes de um ciclo de pinçamento arterial proximal, como a embolização distal por fragmentação de trombo ou fratura de placas ateroscleróticas. Considerando que o procedimento cirúrgico realizado neste estudo clínico envolveu em sua quase totalidade o pinçamento aórtico infrarrenal, sem a isquemia visceral direta, pode-se conjecturar um ganho ainda maior com PCI remoto aplicado previamente ao pinçamento da aorta acima de seus ramos viscerais.

Mas ao comparar estudos clínicos com o presente estudo é necessário algumas considerações. É muito difícil para modelos animais recriarem completamente a complexidade de procedimentos cirúrgicos para o reparo de aneurismas aórticos toracoabdominais. Clinicamente existe importante variabilidade de apresentações

anatômicas que se traduzem em diversas alternativas de nível de pinçamento aórtico aplicado por períodos de tempo bastante distintos. Outro fator relevante neste contexto são as mudanças agudas do volume intravascular por sangramento excessivo, usualmente acompanhado de coagulopatia, que ocorrem frequentemente nestas intervenções e estão associadas a uma maior incidência de complicações e óbito pós-operatório. 42

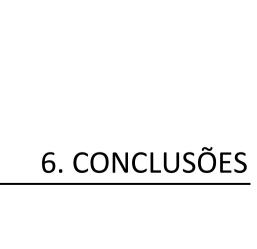
Este modelo experimental foi desenvolvido para isolar o efeito da lesão de I/R causada pelo pinçamento aórtico supracelíaco, permitindo investigar as implicações do PCI local ou remoto sobre a disfunção endotelial, sem que houvesse o viés de uma perfusão tecidual sistêmica reduzida devido à depleção volêmica. O choque hemorrágico e posterior restauração de volume intravascular também são considerados com uma lesão de I/R de "corpo inteiro", 109 e estão associados à inflamação sistêmica com recrutamento leucocitário na microcirculação, 69 motivo pelo qual não foram adicionados ao presente modelo.

Embora estudos em animais devam sempre ser avaliados com cautela para que se aceite suas conclusões como hipóteses clínicas relevantes, 206 muitas vezes é só em laboratório que se pode testar de forma controlada novas intervenções com avaliações diretas, ao invés de desfechos substitutivos. Assim, no presente estudo foi possível analisar as interações leucócito-endotelio *in vivo* na microcirculação mesentérica, bem como a coleta de mesentério e intestino para análises imuno-histoquímicas e histomorfométricas. E esta aproximação da pesquisa básica a questões clínicas fundamentadas é essencial para que as inúmeras descobertas de laboratório consigam se traduzir em intervenções benéficas aos pacientes. 207

Contudo, identificamos algumas limitações de nosso estudo. Uma delas refere-se à metodologia empregada na alocação dos animais nos grupos. Os animais foram incluídos de forma simultânea nos 4 grupos experimentais até que fosse estabelecido um número de sete animais por grupo, mas sem critério de randomização. Ainda que o peso e valores basais de medidas hemodinâmicas e laboratoriais foram semelhantes entre os grupos, não se pode ignorar potenciais diferenças não reconhecidas, que teoricamente poderiam influir nos resultados deste estudo, mesmo se tratando de animais com origem controlada. Por outro lado, todas as avaliações e coletas de dados foram feitas por investigadores independentes e cegos para os grupos experimentais.

A ocorrência de óbito em nosso procedimento também merece comentários. Como foi definido um número de 7 animais por grupo, os animais que evoluíram com óbito durante o experimento foram substituídos, e os procedimentos repetidos. Esta conduta também poderia supostamente influir nos resultados, aumentando ou diminuindo o efeito da intervenção proposta. No entanto os óbitos deste estudo foram relacionados à manipulação inadequada dos animais, e não pela gravidade do modelo experimental, ocorrendo em todos os grupos e não chegando a 10% na amostra. Os óbitos ocorreram por falhas técnicas devido a lesões vasculares ou doses adicionais exageradas de anestésicos ao longo do procedimento, e então não entendemos que a substituição dos óbitos possa ter sido um fator de seleção dos animais e influenciado os resultados.

Assim, considerando as limitações do presente estudo, foi possível demostrar o efeito benéfico PCI local ou remoto no pinçamento aórtico supracelíaco. O reconhecimento das alterações microcirculatórias da lesão de I/R na oclusão aórtica, e o impacto desta disfunção endotelial nos resultados das reconstruções vasculares maiores é de grande importância para o cirurgião vascular. A busca de alternativas para proteção tecidual contra esta agressão tem motivado pesquisas ao longo de décadas, e o PCI se destaca como uma das intervenções mais promissoras neste sentido. Além dos achados experimentais em modelos animais, incluindo o presente estudo, evidências crescentes mostram que o PCI não só ocorre em humanos, mas o faz no contexto de procedimentos que podem ser de benefício real aos pacientes. Desfechos clínicos positivos, como a proteção sistêmica induzida pelo PCI remoto na correção de AAA, reforçam ainda mais a necessidade de investigações adicionais sobre os efeitos desta manobra no contexto da cirurgia vascular aórtica.



6. CONCLUSÕES

- 1. A lesão de I/R causada pelo pinçamento da aorta supracelíaca modifica as interações leucócito-endotélio *in-vivo* e aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio. As manobras de PCI local ou remoto são capazes de modular o recrutamento leucocitário e reduzir a expressão das moléculas de adesão envolvidas neste processo inflamatório.
- 2. O presente modelo de oclusão aórtica supracelíaca causa variações agudas na PAM e leva a importantes alterações laboratoriais. As repercussões histopatológicas da agressão à mucosa intestinal são intensas e incidem principalmente sobre as vilosidades. As manobras de PCI local ou remoto exercem um efeito protetor sobre a mucosa intestinal, o que se traduz positivamente nos parâmetros laboratoriais.



Tabela 1: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) do peso (g) dos animais em cada grupo experimental.

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	00	9	10	11	12	13	14	Média	Ð
Controle	212	230	212	208	239	197	196	202	236	210	202	193	215	238	213,57	4,28
ī,	203	205	218	205	247	231	189	203	192	245	232	207	209	244	216,42	5,28
PCI-L	244	222	218	239	235	198	235	199	236	222	193	218	211	223	220,92	4,31
PCI-R	202	198	253	234	198	243	223	208	240	246	210	216	249	212	223,71	5,32

Tabela 2: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da pressão arterial média (mm Hg) dos animais em cada grupo experimental.

Ŧ	Média	14	13	12	Ħ	10	9	00	7	6	5	4	3	2	1	Controle	Grupo
4,8	99,0	132	85	121	96	101	120	76	113	76	82	90	114	90	90		ಕ
4,2	103,6	122	100	125	105	112	120	82	105	78	92	94	126	92	97		Ç,
		ı						78									110
								75									t15
		ı						83									120
								80							100		125
		ı						0 78							_		130
		ı						83									t35
								3 96							2 110		140
								6 94							_		t50
		ı						4 110									160
								0 105									t70
	: .							5 107									180
		ı						V 128									190
								28 115									1100
															110 1		0 E
								126									-
								137					129	110	105		t120
								130					120		106		1130
4.0	122,9	121	121	138	149	153	122	122	128	107	110	120	119	108	103		t140
3,4	124,8	117	120	142	147	144	128	118	120	102	127	118	132	119	113		1150
33	126,6	115	117	137	150	148	126	128	126	110	121	115	136	128	115		t160
								122							108		1170
								128									1180

Tabela 2 (cont)

	14	13	12	11	10	9	œ	7	6	5	4	3	2	1	PCI-L			14	13	12	Ħ	10	9	œ	7	6	5	4	3	2	-	ŀR	Grupo
109,1 3,4	126	106	102	83	107	123	108	118	118	105	115	125	92	100		4,1	110,1	128	117	108	106	87	115	108	121	111	110	118	140	87	90		8
111,6 3,4	135	109	100	99								124	98	1 12		4,0	112,4	131	124				118	98	122	120	103	115	136	86	93		Ç
3,3			98					122					97	107		3,8	111,4						113					126		8	. :		110
114,8 2,6			•									122	101	111		3,9	115,1	130					130				115			98			t15
3,5	-			162								196				4,2	. 115,9	133) 124							86			t20
) 64,9 1,5			72		2 71		68 88	_		88	83 83	22	R				117,1	151	120	15			125	106	128) 121			98			125
3,2		176		. 176						169	184	210	173	19		4,0	120,2	126	124		108		119			118	. 136	138	144	100	115		130
70,2		63		2			8 74	5 74	1 80	72	59	80	55	72		3,1	120,4	122	128		112		129			121	5 119	133	143	105			135
3,9		3 178	3 177	173	2 176	-	_	189		2 168	2 174) 215	2 171	3 208		. 3,7	184,4	186	192	7 176	2 176	163	176	182	185	198	210	3 200	199	168	2 170		140
175,4			1 173					186				184	163			3,0	178,5	182	186				5 172			3 186	183		183	200	_		t50
67,5				69									-	_			62,3		62				2	1 56	69				-	50			t60
92,6			86					102					106				~	88	88				88						100	90			720
3,9				88								105				3 4,9	9,66	102					æ 83		122	3 135		85		100			180
3 100,3				96									7 90			5,1	99,4						77				-) 126	_			190
3 108,7 1 2,5		5 108	5 102	92					105			120	100	3 114		ı	103,8	156	88			2		101	7 114	2 130	94	2 96	5 128	98			1100
1 103,9													_			l	Ħ						100				·	-					1110
) 107,1 5 24	ı			3 102) 108				113,0						104		7 110				130	5 110			t120
1 107,4 4 2,4				2 105				3 109					: .				0 112,6		6 111				4 108	3 120	0 108		6 118		133	0 120			t130
1 108,2 1 27				108								100	104) 130		3 29	110,9		106				3 103		92		8 110	5 130) 110			t140
2 111,4 7 3,0								2 117) 105	1 109) 138		3,3	111,0		5 112				99		2 88) 117	Ī	3 120) 116	-		1150
1 114,2 3,1	1							7 120				5 110	9 113	3 140		3,2	Ħ		2 107				97		3 102	2 115	7 110	5 131	125	5 120	**		1160
2 113,6 1 2,7		112		5 121	5 122				5 98) 106	3 117				109,1						7 98	2 124	2 104	5 120) 107	122	117) 124	-		1170
				1 116												3,3	Б	6 92					8 94		4 98					:.	-		1180
8 2	12	5	5	9)	1	5	0	6	9,	00	5	5	5	1		۳۱	7	12	0	9	σ,	Ç	4	9	90	0	00	5	0	0	5]

Tabela 2 (cont)

Ŧ	Média	14	13	12	Ħ	10	9	œ	7	6	5	4	ω	2	1	PCLR	Grupo
3,0	104,7	116	110	125	97	8	108	108	116	ይ	98	108	115	97	83		75
2,8	106,6	124	119	120	95	100	97	118	109	105	99	104	110	103	90		Ç,
2,9	87,3	106	95	98	8	86	91	96	96	83	89	75	90	73	68		110
3,4	105,2	130	108	118	104	98	108	119	114	108	102	90	106	92	88		115
3,7	110,2	128	106	122	107	102	113	121	121	100	136	103	104	92	88		120
3,5	113 <i>A</i>	127	107	뙗	113	100	132	117	118	B	128	110	106	8	92		125
2,4	88,6	98	8	88	73	91	83	100	101	æ	88	77	æ	8	79		130
3,4	111,1	114	124	132	106	105	113	128	125	101	115	8	110	89	98		135
4,9		196	189	186	泛	186	162	184	173	ᅜ	210	175	180	145	163		140
4,0	172,9	192	281	177	147	180	158	180	163	146	193	183	176	171	170		50
1,9	67,4	76	71	88	76	61	67	62	67	66	70	2	79	50	66		160
3,2	93,5	8	106	2	92	æ	Ы	æ	110	87	114	79	88	78	104		t70 t
3,4		106	88	108	88	102	88	83	106	99	124	К	99	99	105		180
y U		110	109	112	92	110	94	103	112	100	131	78	103	96	103		190
33	110,0	116	1 0	116	107	107	102	126	114	109	124	83	100	108	130		1100
2,3		112	112	114	113	108	88	109	117	111	120	88	97	100	126		1110
2,8	1124	113	124	121	117	107	92	112	120	110	117	110	104	96	131		t120
2,7	112,6	121	116	114	118	112	102	114	124	107	110	107	100	97	134		1130
2.5	112	Ħ	114	112	114	115	107	105	119	111	115	106	105	97	137		t140
2,6	Ę	15	110	135	113	122	5	118	117	109	109	Ę	107	94	135		1150
2,2	114,5	Ħ	117	110	110	118	107	115	123	ᄩ	117	110	114	100	135		t120 t130 t140 t150 t160 t170 t180
2,4	111,6	102	107	103	106	120	106	117	121	118	108	114	115	96	130		1170
3,0	112,6	ı	111	99	112	127	100	121	118	120	105	116	121	88	132		1180

Tabela 3: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) do pH arterial dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	7,391	7,451	7,373	7,321	7,377	7,371	7,426	7,387	0,015
t180	7,459	7,363	7,308	7,366	7,386	7,361	7,383	7,375	0,017
Grupo I-R									
t0	7,473	7,44	7,409	7,373	7,38	7,51	7,39	7,425	0,019
t180	7,335	7,322	7,26	7,299	7,361	7,308	7,079	7,280	0,035
Grupo PCI-L									
t0	7,465	7,406	7,354	7,41	7,443	7,372	7,396	7,406	0,014
t180	7,381	7,286	7,31	7,34	7,272	7,31	7,413	7,330	0,019
Grupo PCI-R									
t0	7,349	7,482	7,433	7,382	7,472	7,347	7,442	7,415	0,021
t180	7,285	7,275	7,23	7,365	7,287	7,291	7,399	7,318	0,024

Tabela 4: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) do excesso de base arterial (mEq/L) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	-2,7	2,2	-4,1	-2,4	-2,2	-2,7	-3,6	-2,21	0,77
t180	-3,7	-5,7	-6,4	-7	-7,2	-6,8	-7	-6,25	0,46
Grupo I-R									
t0	-0,4	-2	-2,1	-5,8	-4,7	0,2	-3,8	-2,67	0,83
t180	-16,7	-14,7	-15,9	-15,6	-9,9	-13,6	-24,3	-15,81	1,64
Grupo PCI-L									
t0	-4,4	-4,2	-4	-3,5	-0,9	-1,9	-3,5	-3,2	0,49
t180	-10,4	-15,5	-12,6	-12,4	-14,8	-6,7	-8,8	-11,6	1,19
Grupo PCI-R									
t0	-5,3	-0,3	0,1	-1,7	-0,9	-4,8	-2,6	-2,21	0,80
t180	-13,8	-15,6	-6,9	-11,8	-13,3	-9,5	-9,4	-11,47	1,14

Tabela 5: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da pressão parcial de CO₂ arterial (mm Hg) dos animais em cada grupo experimental.

	4		-	4		_		N A Á al:a	
	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	35,6	37,2	35	37,7	38,6	38,2	29,5	35,97	1,18
t180	25,9	32,9	39,1	29,7	27	30,8	27,7	30,44	1,70
Grupo I-R									
t0	30	30,9	34,5	31,4	32,9	27	33,5	31,45	0,94
t180	14	18,8	22,1	19	24,4	22,3	19,3	19,98	1,27
Grupo PCI-L									
t0	24,1	30,6	36	31,5	32,6	39,9	33,3	32,57	1,84
t180	18,5	20,3	25,2	21,4	24,3	20,1	21,5	21,61	0,89
Grupo PCI-R									
t0	35,9	29,2	35,6	38,9	29,3	37	29,5	33,62	1,57
t180	31,1	21,1	24,5	22,4	18	19,6	21,7	22,62	1,61

Tabela 6: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da concentração de HCO₃ arterial (mEq/L) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	21,1	25,6	19,9	21,8	22,1	21,6	19	21,58	0,78
t180	18,1	18,2	19	16,6	15,9	17	16,1	17,27	0,44
Grupo I-R									
t0	21,7	20,6	21,4	17,8	19	21,5	19,8	20,25	0,55
t180	7,3	9,4	9,6	9	13,5	10,8	5,5	9,3	0,95
Grupo PCI-L									
t0	17,1	18,8	20,6	19,6	21,9	22,7	20	20,1	0,71
t180	12,5	9,4	11,8	11,2	10,4	13,6	13,5	11,77	0,59
Grupo PCI-R									
t0	19,2	21,6	23,4	22,6	21,1	19,8	19,8	21,07	0,59
t180	12,6	9,5	15,4	11,4	9,4	11,1	13,2	11,8	0,80

Tabela 7: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da pressão parcial de O₂ arterial (mm Hg) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	111	78,6	117,5	114,1	85,5	87,1	96,1	98,55	5,89
t180	105,4	97,3	98	132,8	83	129,4	93,2	105,62	7,04
Grupo I-R									
t0	97,5	108,9	95,9	79,9	98,6	113,5	85,2	97	4,54
t180	116,3	127,6	107,1	114,4	108,9	99,2	116,9	112,91	3,39
Grupo PCI-L									
t0	94,8	109,8	128,7	83,3	113,4	84,5	89,8	100,61	6,44
t180	114,6	128,6	108,8	99,4	103,9	111	96,2	108,92	4,08
Grupo PCI-R									
t0	97,9	85,4	82,4	93,5	86,8	85,3	110,4	91,67	3,72
t180	95,6	86,9	98,3	119,2	98,1	111,3	94,9	100,61	4,13

Tabela 8: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da saturação de O₂ arterial (%) arterial dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	98,4	95,3	98,3	98,2	96,1	96,4	97,5	97,17	0,46
t180	98,2	97,2	96,9	98,8	96,1	98,7	97,1	97,57	0,38
Grupo I-R									
t0	97,8	98,2	97,4	95,4	97,4	98,6	95,8	97,22	0,45
t180	98,3	98,6	97,5	98	98	97,2	97,1	97,81	0,21
Grupo PCI-L									
t0	97,7	98,1	98,6	96,1	98,4	95,7	96,8	97,34	0,43
t180	98,3	98,5	97,8	97,3	97,3	98,6	97,5	97,9	0,21
Grupo PCI-R									
t0	97,2	95,9	96,3	97	97	95,9	98,1	96,77	0,30
t180	96,2	95,7	97,6	98,4	97,6	98,6	95,9	97,14	0,45

Tabela 9: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da concentração de potássio arterial (mEq/L) dos animais em cada grupo experimental.

_	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	3,8	3,6	2,8	2,5	3,1	2,6	3	3,05	0,18
t180	3,6	3,9	3,1	3,5	3,2	3,6	3,4	3,47	0,10
Grupo I-R									
t0	3,9	3,7	2,7	2,7	3,3	2,8	2,7	3,11	0,19
t180	4,6	3,7	4,1	3,5	3,4	3,8	4,4	3,92	0,17
Grupo PCI-L									
t0	3,7	3,5	2,8	3,1	2,6	2,9	3	3,08	0,14
t180	5,1	3,6	2,7	3,1	3,4	3,4	3,2	3,5	0,28
Grupo PCI-R									
t0	1,9	3,2	2,7	3,2	3,5	4,1	2,9	3,07	0,25
t180	3,7	3,5	3,2	3,8	3,4	4,5	2,9	3,57	0,19

Tabela 10: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) concentração de lactato arterial (mmol/L) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	1,5	1,1	1,1	1	1,1	1	1,5	1,18	0,08
t180	1,5	1,5	1,8	1,2	2,1	1,7	1,8	1,65	0,10
Grupo I-R									
t0	1,5	1,4	1,4	1,1	2,2	1,6	1,8	1,57	0,13
t180	6,4	4	6,6	3,7	3,6	4,9	4,8	4,85	0,46
Grupo PCI-L									
t0	1,4	1	1,5	1,6	1,2	1,2	1,7	1,37	0,09
t180	2,5	4,2	2,7	2,7	3,6	2,7	2,4	2,97	0,25
Grupo PCI-R									
t0	1,5	0,7	1	1,5	1,7	1,1	1,6	1,3	0,13
t180	4,9	3,6	3,3	2,5	2,4	3,1	2,9	3,24	0,31

Tabela 11: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) concentração de desidrogenase lática arterial (U/L) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle	291	2535	1860	1384	790	670	578	1158,28	204,78
Grupo I-R	5976	8363	11853	8796	11331	12832	7069	9460	977,08
Grupo PCI-L	6730	5340	7330	10071	3359	8484	4270	6512	894,60
Grupo PCI-R	5285	10070	7214	1568	5547	1169	2835	4812,57	1213,84

Tabela 12: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) do hematócrito (%) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	50	57	52	48	52	44	43	49,42	1,84
t180	45	49	50	53	51	49	48	49,28	0,94
Grupo I-R									
t0	47	52	49	49	54	46	49	49,42	1,04
t180	52	59	59	59	61	55	55	57,14	1,20
Grupo PCI-L									
t0	48	47	51	53	53	50	46	49,71	1,06
t180	53	54	52	53	59	52	50	53,28	1,06
Grupo PCI-R									
t0	50	48	53	48	50	45	47	48,71	0,96
t180	55	53	53	48	53	55	49	52,28	1,04

Tabela 13: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da contagem total de leucócitos (cel/mm³) dos animais em cada grupo experimental.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	8.250	10.350	14.450	13.650	15.450	14.150	12.500	12.685,71	963,54
t180	12.600	12.050	18.900	18.000	21.900	17.200	16.000	16.664,29	1.315,96
Grupo I-R									
t0	10.500	18.000	11.650	10.600	9.200	11.500	15.300	12.392,86	1.117,48
t180	14.700	47.200	33.750	25.900	31.600	46.600	34.600	33.478,57	4.296,67
Grupo PCI-L									
t0	12.450	14.600	15.400	12.600	9.650	15.600	13.750	13.435,71	786,77
t180	21.700	29.450	34.600	36.400	36.800	20.600	25.400	29,278,57	2.597,75
Grupo PCI-R									
t0	10.650	11.850	14.000	10.450	16.400	11.550	10.850	12.250	826,56
t180	23.700	30.950	16.600	22.750	40.750	34.350	16.000	26.442,86	3.500,43

Tabela 14: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da contagem de neutrófilos dos animais em cada grupo experimental. Números absolutos (cel/mm³) e percentuais (%), em parênteses.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	2.310	2.277	2.746	4.778	5.099	3.396	2.750	3.336,35	437,91
	(28%)	(22%)	(19%)	(35%)	(33%)	(24%)	(22%)	(26,14%)	(2,28%)
t180	8.946	9.761	15.687	11.160	14.235	5.848	13.440	11.296,64	1291,86
	(71%)	(81%)	(83%)	(62%)	(65%)	(34%)	(84%)	(68,57%)	(6,65%)
Grupo I-R									
t0	1.575	3.240	2.913	2.332	1.840	2.070	3.825	2.542,07	307,26
	(15%)	(18%)	(25%)	(22%)	(20%)	(18%)	(25%)	(20,42%)	(1,42%)
t180	11.760	41.064	25.988	13.209	20.224	32.154	25.258	24.236,64	3.913,74
	(80%)	(87%)	(77%)	(51%)	(64%)	(69%)	(73%)	(71,57%)	(4,43%)
Grupo PCI-L									
t0	2.988	5.694	3.234	4.158	2.027	4.836	2.063	3.571,28	524,77
	(24%)	(39%)	(21%)	(33%)	(21%)	(31%)	(15%)	(26,28%)	(3,15%)
t180	18.011	23.266	25.950	26.208	31.280	14.214	16.510	22.2205,5	2.326,90
	(83%)	(79%)	(75%)	(72%)	(85%)	(69%)	(65%)	(75,42%)	(2,77%)
Grupo PCI-R									
t0	2.769	2.963	1.960	2.195	4.264	2.195	2.821	2.737,92	292,07
	(26%)	(25%)	(14%)	(21%)	(26%)	(19%)	(26%)	(22,42%)	(1,75%)
t180	17.775	23.213	10.126	13.195	32.193	22.671	10.080	18.464,57	3.073,58
	(75%)	(75%)	(61%)	(58%)	(79%)	(66%)	(63%)	(68,14%)	(3,07%)

Tabela 15: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da contagem de monócitos dos animais em cada grupo experimental. Números absolutos (cel/mm³) e percentuais (%), em parênteses.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	578	518	1.301	1.229	618	1.132	875	892,71	124,61
	(7%)	(5%)	(9%)	(9%)	(4%)	(8%)	(7%)	(7%)	(0,72%)
t180	126	362	567	360	657	860	320	464,5	92,70
	(1%)	(3%)	(3%)	(2%)	(3%)	(5%)	(2%)	(2,71%)	(0,47%)
Grupo I-R									
t0	945	1.440	583	636	920	805	1.071	914,21	109,25
	(9%)	(8%)	(5%)	(6%)	(10%)	(7%)	(7%)	(7,42%)	(0,64%)
t180	441	1.416	1.013	1.295	1.896	932	1.730	1.246,07	188,30
	(3%)	(3%)	(3%)	(5%)	(6%)	(2%)	(5%)	(3,85%)	(0,55%)
Grupo PCI-L									
t0	747	1.168	462	882	483	780	1.100	803,07	103,54
	(6%)	(8%)	(3%)	(7%)	(5%)	(5%)	(8%)	(6%)	(0,69%)
t180	434	1.767	1.038	2.184	368	618	762	1.024,42	263,21
	(2%)	(6%)	(3%)	(6%)	(1%)	(3%)	(3%)	(3,42%)	(0,71%)
Grupo PCI-R									
t0	533	1.185	840	836	820	809	868	841,42	71,67
	(5%)	(10%)	(6%)	(8%)	(5%)	(7%)	(8%)	(7%)	(0,69%)
t180	474	929	1.162	1.365	815	2.061	800	1.086,5	194,49
	(2%)	(3%)	(7%)	(6%)	(2%)	(6%)	(5%)	(4,42%)	(0,78%)

Tabela 16: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da contagem de linfócitos dos animais em cada grupo experimental. Números absolutos (cel/mm³) e percentuais (%), em parênteses.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	8.250	10.350	14.450	13.650	15.450	14.150	12.500	12.685,71	963,54
	(64%)	(73%)	(71%)	(56%)	(63%)	(68%)	(71%)	(66,57%)	(2,25%)
t180	12.600	12.050	18.900	18.000	21.900	17.200	16.600	16.664,29	1.315,96
	(28%)	(16%)	(14%)	(36%)	(31%)	(60%)	(13%)	(28,28%)	(6,28%)
Grupo I-R									
t0	10.500	18.000	11.650	10.600	9.200	11.500	15.300	12.392,86	1.177,48
	(76%)	(74%)	(69%)	(72%)	(69%)	(74%)	(68%)	(71,71%)	(1,16%)
t180	14.700	47.200	33.750	25.900	31.600	46.600	34.600	3.3478,57	4.296,67
	(17%)	(10%)	(19%)	(44%)	(30%)	(29%)	(22%)	(24,42%)	(2,48%)
Grupo PCI-L									
t0	12.450	14.600	15.400	12.600	9.650	15.600	13.750	13.435,71	786,77
	(70%)	(53%)	(76%)	(60%)	(74%)	(64%)	(77%)	(67,71%)	(3,41%)
t180	21.700	29.450	34.600	36.4002	36.800	20.600	25.400	29.278,57	2.597,75
	(15%)	(15%)	(22%)	(2%)	(14%)	(27%)	(31%)	(20,85%)	(2,48%)
Grupo PCI-R									
t0	10.650	11.850	14.000	10.450	16.400	11.550	10.850	12.250	826,56
	(69%)	(55%)	(80%)	(71%)	(68%)	(74%)	(66%)	(69%)	(2,91%)
t180	23.700	30.950	16.600	22.750	40.750	34.350	16.000	26.442,86	3.500,43
	(23%)	(22%)	(32%)	(36%)	(19%)	(28%)	(32%)	(27,42%)	(2,36%)

Tabela 17: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da contagem de eosinóifilos dos animais em cada grupo experimental. Número absoluto (cel/mm³) e percentual (%), em parênteses.

	1	2	3	4	5	6	7	Média	EP
Grupo Controle									
t0	83	0	145	0	0	0	0	32,42	21,99
	1%	0%	1%	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0,28%)	(0,18%)
t180	0	0	0	0	219	172	160	99,81	37,75
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1%)	(1%)	(1%)	(0,42%)	(0,20%)
Grupo I-R									
t0	0	0	117	0	92	115	0	46,21	21,99
	(0%)	(0%)	(1%)	(0%)	(1%)	(1%)	(0%)	(0,42%)	(0,20%
t180	`o´	`o´	338	`o´	`o´	`o´	`o´	127,56	48,21
3_00	(0%)	(0%)	(1%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0,14%)	(0,14%)
Grupo PCI-L									
t0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
t180	0	0	0	0	0	206	254	113,08	42,74
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1%)	(1%)	(0,28%)	(0,18%)
Grupo PCI-R									
t0	0	0	0	0	164	0	0	23,42	23,42
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(1%)	(0%)	(0%)	(0,14%)	(0,14%)
t180	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

Tabela 18: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) dos achados da microscopia intravital dos animais em cada grupo experimental.

Grupo	Leucócitos em	Velocidade	Leucócitos	Leucócitos	Diâmetro	Diâmetro
-	rolamento	de rolamento	aderidos	migrados	arteriolar	venular
Controle	101	62.20	2.5	2.22	40.0	40.72
1	101	63,20	2,5	2,33	10,8	18,73
2	119	72,32	3,66	2,88	15,87	19,30
3	128,5	132,37	3,75	3,75	10,02	15,57
4	129,5	121,79	4,75	4,58	12,52	16,28
5	127,5	111,66	4,5	4,08	13,13	17,90
6	114	98,17	4	3,83	10,63	19,01
7	114,5	83,57	2	4,25	9,96	15,88
Média	119,14	97,58	3,59	3,67	11,84	17,52
EP	3,90	9,77	0,38	0,29	0,81	0,59
I-R						
1	291	50,95	19,5	19,75	14,15	18,26
2	207	50,41	16,83	16,66	9,03	15,74
3	273,2	30,71	19,33	20,66	13,91	20,42
4	232	79,40	9,5	9,44	9,83	19,29
5	227,5	45,76	19,75	23	11,94	19,31
6	240	45,85	18	18,5	11,95	17,59
7	280	26,91	21,5	21,66	10,03	15,34
Média	250,10	47,14	17,77	18,52	11,55	17,99
EP	11,85	6,45	0,55	0,78	0,75	0,71
PCI-L						
1	208,25	56,22	17	16,12	17,11	18,54
2	182,5	58,68	16,5	15,75	14,97	16,89
3	221	62,94	15,25	13,75	13,77	20,60
4	195,66	71,30	13,16	15	14,22	21,51
5	225,5	59,50	17,5	15,5	13,95	20,07
6	220,5	56,41	14	13,33	8,73	18,49
7	207	39,71	16	15	6,66	20,17
Média	208,63	57,82	15,63	14,92	12,77	19,47
EP	5,83	3,59	0,60	0,38	, 1,39	0,59
PCI-R	·	·		·	·	,
1	204	53,49	16,25	14,55	16,31	16,65
2	164	57,36	14,75	17,25	9,85	17,18
3	199	47,26	17	17,5	16,6	20,1
4	236,5	50,84	12,83	13,91	9,67	14,83
5	196	55,64	16,25	14	14,74	20,21
6	228,5	47,00	18	12,83	15,51	20,97
7	152,5	59,56	11,75	12,03	10,54	21,54
Média	197,21	53,02	15,26	14,57	13,31	18,78
EP	11,62	1,84	0,85	0,78	1,19	0,96

Tabela 19: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da expressão de P-selectina no mesentério em cada grupo experimental.

Variável	Controle	I-R	PCI-L	PCI-R
P-selectina	4,61	9,14	3,51	1,98
	5,23	11,27	2,71	2,06
	7,07	8,47	2,04	1,52
	6,23	11,57	1,23	1,42
	3,29	6,74	1,08	1,28
	2,04	6,34	1,04	1,53
	3,14	6,25	1,08	1,75
	3,2	6,34	1,82	1,02
	2,75	4,51	1,83	1,46
	1,75	4,38	1,02	1,01
	1,81	4,72	1,29	1,41
	1,01	4,75	0,51	1,23
	1,44	2,76	1,02	0,54
	1,85	3,59	0,73	1,05
	2,01	4,51	1,01	1,04
	2,33	1,38	1,17	0,94
	3,62	2,25		
	1,69	1,39		
	1,58	2,92		
	1,48			
	1,54			
Média	2,84	5,44	1,44	1,33
EP	0,36	0,69	0,19	0,10

Tabela 20: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da expressão de E-selectina no mesentério em cada grupo experimental.

Variável	Controle	I-R	PCI-L	PCI-R
E-selectina	4,64	14,61	2,34	2,41
	5,92	9,68	2,55	2,94
	4,06	11,97	3,49	3,13
	2,24	7,25	2,13	2,68
	1,91	6,36	2,45	2,14
	3,62	5,74	2,89	2,01
	1,71	5,13	1,78	1,15
	3,17	4,14	1,79	1,6
	1,14	5,24	1,78	1,51
	2,28	3,89	2,07	1,75
	1,34	5,4	1,69	1,54
	1,33	2,91	1,65	1,14
	1,36		1,53	1,68
	1,92		1,17	1,49
				1,35
Média	2,62	6,86	2,09	1,90
EP	0,39	1,01	0,16	0,16

Tabela 21: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) da expressão de ICAM-1 no mesentério em cada grupo experimental.

Variável	Controle	I-R	PCI-L	PCI-R	
ICAM-1	4,38	12,86	5,55	3,59	
	5,98	15,31	5,07	6,34	
	4,25	15,11	6,66	6,24	
	3,75	10,41	7,51	2,23	
	3,3	9,11 4,22		3,06	
	2,93	10,11	6,33	1,92	
	2,81	8,79	5,39	1,32	
	3,25	10,34	4,67	1,77	
	2,38	5,21	3,09	1,66	
	2,78	4,72	3,47	1,45	
	1,29	3,29	3,35	1,53	
	2,61	5,05	3,92	1,56	
	1,53	6,27	1,9	1,78	
	1,52	7,11	1,39	1,03	
	1,31	7,26	1,66	1,05	
	2,28	8,25	1,92	1,14	
	1,38	2,21	1,28	1,06	
	1,25	2,92	2,16	1,07	
	1,89	2,91	1,38	1,06	
	1,14		6,09	0,89	
	1,21				
Média	2,53	7,75	3,85	2,09	
EP	0,28	0,91	0,44	0,36	

Tabela 22: Valores individuais, médias e erros padrões (EP) dos achados histopatológicos do intestino dos animais em cada grupo experimental.

Grupo	Expessura Total da Mucosa	Altura da Vilosidade	Profundidade da Cripta	Relação Altura da Vilosidade / Profundidade da cripta
Controle				
1	445	297	167	1,8
2	558	417	206	2,0
3	485	295	179	1,6
4	489	334	163	2,0
5	637	411	238	1,7
6	516	327	165	2,0
7	566	345	173	2,0
Média	528,01	346,60	184,60	1,88
EP	24,17	18,83	10,40	0,06
I-R				
1	234	115	100	1,1
2	271	105	130	,8
3	168	73	83	,9
4	239	108	105	1,0
5	277	100	122	,8
6	245	109	115	,9
7	277	134	123	1,1
Média	244,52	106,13	111,40	0,95
EP	14,54	6,94	6,22	0,05
PCI-L				
1	613	360	190	1,9
2	402	217	151	1,4
3	501	289	178	1,6
4	479	312	159	2,0
5	424	234	176	1,3
6	501	273	202	1,4
7	409	241	149	1,6
Média	475,56	275,17	172,09	1,60
EP	27,95	18,93	7,61	0,05
PCI-R				
1	451	277	180	1,5
2	471	277	183	1,5
3	452	274	176	1,6
4	462	284	170	1,7
5	511	286	218	1,3
6	360	194	152	1,3
7	479	276	205	1,3
Média	455,16	266,68	183,26	1,46
EP	17,60	12,26	8,33	0,05



8. REFERÊNCIAS

- (1) Heron MP, Hoyert DL, Murphy SL, Xu JQ, Kochanek KD, Tejada-Vera B. Deaths: Final data for 2006. National vital statistics reports; vol 57 no 14. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2009. http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr57/nvsr57_14.pdf
- (2) Filipovic M, Goldacre MJ, Roberts SE, Yeates D, Duncan ME, Cook-Mozaffari P. Trends in mortality and hospital admission rates for abdominal aortic aneurysm in England and Wales, 1979-1999. *Br J Surg* 2005 August;92(8):968-75.
- (3) Fowkes FG, Macintyre CC, Ruckley CV. Increasing incidence of aortic aneurysms in England and Wales. *BMJ* 1989 January 7;298(6665):33-5.
- (4) Bown MJ, Sutton AJ, Bell PR, Sayers RD. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 2002 June;89(6):714-30.
- (5) Blankensteijn JD, Lindenburg FP, van der GY, Eikelboom BC. Influence of study design on reported mortality and morbidity rates after abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 1998 December;85(12):1624-30.
- (6) Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Jr., Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2003 May;37(5):1106-17.
- (7) Hertzer NR, Mascha EJ, Karafa MT, O'Hara PJ, Krajewski LP, Beven EG. Open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: the Cleveland Clinic experience from 1989 to 1998. *J Vasc Surg* 2002 June;35(6):1145-54.
- (8) Elkouri S, Gloviczki P, McKusick MA et al. Perioperative complications and early outcome after endovascular and open surgical repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2004 March;39(3):497-505.
- (9) Conrad MF, Crawford RS, Pedraza JD et al. Long-term durability of open abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2007 October;46(4):669-75.
- (10) Johnston KW. Multicenter prospective study of nonruptured abdominal aortic aneurysm. Part II. Variables predicting morbidity and mortality. *J Vasc Surg* 1989 March;9(3):437-47.
- (11) Dardik A, Lin JW, Gordon TA, Williams GM, Perler BA. Results of elective abdominal aortic aneurysm repair in the 1990s: A population-based analysis of 2335 cases. *J Vasc Surg* 1999 December;30(6):985-95.

- (12) Lawrence PF, Gazak C, Bhirangi L et al. The epidemiology of surgically repaired aneurysms in the United States. *J Vasc Surg* 1999 October;30(4):632-40.
- (13) Huber TS, Wang JG, Derrow AE et al. Experience in the United States with intact abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2001 February;33(2):304-10.
- (14) Schlosser FJ, Vaartjes I, van der Heijden GJ et al. Mortality After Elective Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Ann Surg* 2009 October 15.
- (15) Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet* 2004 September 4;364(9437):843-8.
- (16) Endovascular aneurysm repair versus open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1): randomised controlled trial. *Lancet* 2005 June 25;365(9478):2179-86.
- (17) Hopkins R, Bowen J, Campbell K et al. Effects of study design and trends for EVAR versus OSR. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(5):1011-22.
- (18) Leurs LJ, Buth J, Harris PL, Blankensteijn JD. Impact of study design on outcome after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. A comparison between the randomized controlled DREAM-trial and the observational EUROSTAR-registry. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007 February;33(2):172-6.
- (19) Lederle FA, Freischlag JA, Kyriakides TC et al. Outcomes following endovascular vs open repair of abdominal aortic aneurysm: a randomized trial. *JAMA* 2009 October 14;302(14):1535-42.
- (20) Hua HT, Cambria RP, Chuang SK et al. Early outcomes of endovascular versus open abdominal aortic aneurysm repair in the National Surgical Quality Improvement Program-Private Sector (NSQIP-PS). *J Vasc Surg* 2005 March;41(3):382-9.
- (21) Parodi JC. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms and other arterial lesions. *J Vasc Surg* 1995 April;21(4):549-55.
- (22) Landry G, Lau I, Liem T, Mitchell E, Moneta G. Open abdominal aortic aneurysm repair in the endovascular era: effect of clamp site on outcomes. *Arch Surg* 2009 September;144(9):811-6.
- (23) Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL et al. The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines. *J Vasc Surg* 2009 October;50(4 Suppl):S2-49.
- (24) Endovascular aneurysm repair and outcome in patients unfit for open repair of abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 2): randomised controlled trial. *Lancet* 2005 June 25;365(9478):2187-92.

- (25) Wolf YG, Fogarty TJ, Olcott C, IV et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: eligibility rate and impact on the rate of open repair. *J Vasc Surg* 2000 September;32(3):519-23.
- (26) Arko FR, Lee WA, Hill BB et al. Impact of endovascular repair on open aortic aneurysm surgical training. *J Vasc Surg* 2001 November;34(5):885-91.
- (27) Sternbergh WC, III, York JW, Conners MS, III, Money SR. Trends in aortic aneurysm surgical training for general and vascular surgery residents in the era of endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2002 October;36(4):685-9.
- (28) Lin PH, Bush RL, Milas M et al. Impact of an endovascular program on the operative experience of abdominal aortic aneurysm in vascular fellowship and general surgery residency. *Am J Surg* 2003 August;186(2):189-93.
- (29) Choi ET, Wyble CW, Rubin BG et al. Evolution of vascular fellowship training in the new era of endovascular techniques. *J Vasc Surg* 2001 February;33(2 Suppl):S106-S110.
- (30) Costin JA, Watson DR, Duff SB, Edmonson-Holt A, Shaffer L, Blossom GB. Evaluation of the complexity of open abdominal aneurysm repair in the era of endovascular stent grafting. *J Vasc Surg* 2006 May;43(5):915-20.
- (31) Knott AW, Kalra M, Duncan AA et al. Open repair of juxtarenal aortic aneurysms (JAA) remains a safe option in the era of fenestrated endografts. *J Vasc Surg* 2008 April;47(4):695-701.
- (32) Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ et al. Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. *J Vasc Surg* 1986 March;3(3):389-404.
- (33) Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ. Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg* 1993 February;17(2):357-68.
- (34) Cambria RP, Davison JK, Zannetti S et al. Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 1997 February;25(2):234-41.
- (35) Cambria RP, Davison JK, Giglia JS, Gertler JP. Mesenteric shunting decreases visceral ischemia during thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 1998 April;27(4):745-9.
- (36) Jacobs MJ, de Mol BA, Legemate DA, Veldman DJ, de HP, Kalkman CJ. Retrograde aortic and selective organ perfusion during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997 November;14(5):360-6.
- (37) Coselli JS. The use of left heart bypass in the repair of thoracoabdominal aortic aneurysms: current techniques and results. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2003 October;15(4):326-32.

- (38) Black JH, Davison JK, Cambria RP. Regional hypothermia with epidural cooling for prevention of spinal cord ischemic complications after thoracoabdominal aortic surgery. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2003 October;15(4):345-52.
- (39) Safi HJ, Miller CC, III, Huynh TT et al. Distal aortic perfusion and cerebrospinal fluid drainage for thoracoabdominal and descending thoracic aortic repair: ten years of organ protection. *Ann Surg* 2003 September;238(3):372-80.
- (40) Hassoun HT, Miller CC, III, Huynh TT, Estrera AL, Smith JJ, Safi HJ. Cold visceral perfusion improves early survival in patients with acute renal failure after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2004 March;39(3):506-12.
- (41) Coselli JS, Bozinovski J, LeMaire SA. Open surgical repair of 2286 thoracoabdominal aortic aneurysms. *Ann Thorac Surg* 2007 February;83(2):S862-S864.
- (42) Conrad MF, Crawford RS, Davison JK, Cambria RP. Thoracoabdominal aneurysm repair: a 20-year perspective. *Ann Thorac Surg* 2007 February;83(2):S856-S861.
- (43) Cowan JA, Jr., Dimick JB, Henke PK, Huber TS, Stanley JC, Upchurch GR, Jr. Surgical treatment of intact thoracoabdominal aortic aneurysms in the United States: hospital and surgeon volume-related outcomes. *J Vasc Surg* 2003 June;37(6):1169-74.
- (44) Rigberg DA, McGory ML, Zingmond DS et al. Thirty-day mortality statistics underestimate the risk of repair of thoracoabdominal aortic aneurysms: a statewide experience. *J Vasc Surg* 2006 February;43(2):217-22.
- (45) Harward TR, Welborn MB, III, Martin TD et al. Visceral ischemia and organ dysfunction after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. A clinical and cost analysis. *Ann Surg* 1996 June;223(6):729-34.
- (46) Baptista-Silva JCC. Definição de isquemia. In: Baptista-Silva JCC, editor. *Cirurgia Vascular: Guia Ilustrado*. São Paulo: 2001. Disponível em: http://www.bapbaptista.com
- (47) Di LF, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 2006 May 1;70(2):191-9.
- (48) Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 2006;1:405-34.
- (49) Brandao ML, Roselino JE, Piccinato CE, Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003 March;110(1):235-40.
- (50) Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1988 December;255(6 Pt 2):H1269-H1275.
- (51) Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007 January;9(1):49-89.

- (52) Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001 March;53(1):135-59.
- (53) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007 January;87(1):315-424.
- (54) Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res* 2007 December;41(12):1364-75.
- (55) Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006 January;147 Suppl 1:S193-S201.
- (56) Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004;70:71-86.
- (57) Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005 July;19(4):572-84.
- (58) Welborn MB, Oldenburg HS, Hess PJ et al. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Crit Care Med* 2000 September;28(9):3191-7.
- (59) Back MR, Bandyk M, Bradner M et al. Critical analysis of outcome determinants affecting repair of intact aneurysms involving the visceral aorta. *Ann Vasc Surg* 2005 September;19(5):648-56.
- (60) Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000 February;190(3):255-66.
- (61) Sternbergh WC, Makhoul RG, Adelman B. Nitric oxide-mediated, endothelium-dependent vasodilation is selectively attenuated in the postischemic extremity. *Surgery* 1993 November;114(5):960-7.
- (62) Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K. Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1997 August;273(2 Pt 2):H989-H996.
- (63) Ames A, III, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The noreflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968 February;52(2):437-53.
- (64) Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974 December;54(6):1496-508.
- (65) Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol* 2009 July 21;54(4):281-92.
- (66) Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M et al. Molecular determinants of reperfusioninduced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994 February;74(2):336-43.

- (67) Oliver MG, Specian RD, Perry MA, Granger DN. Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. *Inflammation* 1991 October;15(5):331-46.
- (68) Gavins FN, Chatterjee BE. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: focus on the mesentery and cremaster preparations. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004 January;49(1):1-14.
- (69) Yada-Langui MM, njos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004 July;229(7):684-93.
- (70) Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ et al. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. *Shock* 2006 August;26(2):180-6.
- (71) Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991 December 20;67(6):1033-6.
- (72) Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994 May;55(5):662-75.
- (73) Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 1996 October;32(4):733-42.
- (74) Kakkar AK, Lefer DJ. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 2004 April;4(2):154-8.
- (75) Smith CW. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2008 February;121(2 Suppl):S375-S379.
- (76) Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- (77) Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995 July;9(10):866-73.
- (78) Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002 April;14(2):73-81.
- (79) Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 1993 August 13;74(3):541-54.
- (80) Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 December;84(24):9238-42.

- (81) Ley K, Bullard DC, Arbones ML et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995 February 1;181(2):669-75.
- (82) Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC, Pinsky DJ. Failure to express the P-selectin gene or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 January 21;94(2):757-61.
- (83) Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H et al. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med* 1996 May 1;183(5):2329-36.
- (84) Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 1999 June 1;162(11):6755-62.
- (85) Robinson SD, Frenette PS, Rayburn H et al. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 September 28;96(20):11452-7.
- (86) Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol* 2009;27:339-62.
- (87) Argenbright LW, Letts LG, Rothlein R. Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits. *J Leukoc Biol* 1991 March;49(3):253-7.
- (88) Kubes P, Grisham MB, Barrowman JA, Gaginella T, Granger DN. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. *Am J Physiol* 1991 December;261(6 Pt 2):H1872-H1879.
- (89) Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L et al. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993 September;92(3):1504-16.
- (90) Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 1999 December;66(6):876-88.
- (91) Souza-Moraes MR, vid-Filho R, Baptista-Silva JC et al. Effect of antibodies to intercellular adhesion molecule type 1 on the protection of distant organs during reperfusion syndrome in rats. *Braz J Med Biol Res* 2003 May;36(5):605-12.
- (92) Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 2005 April;77(4):487-95.
- (93) Vestweber D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol* 2000 February;190(3):281-91.
- (94) Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 1993 December 3;262(5139):1580-2.

- (95) Mathers CD, Boerma T, Ma FD. Global and regional causes of death. *Br Med Bull* 2009 September 22.
- (96) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 November;74(5):1124-36.
- (97) Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993 June;72(6):1293-9.
- (98) Dayton C, Yamaguchi T, Warren A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic arteriolar, capillary, and postcapillary venular dysfunction: signaling pathways mediating the adaptive metamorphosis to a protected phenotype in preconditioned endothelium. *Microcirculation* 2002 April;9(2):73-89.
- (99) Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005 February;29(2):106-15.
- (100) Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993 March;87(3):893-9.
- (101) Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996 November 1;94(9):2193-200.
- (102) Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 1997 September 2;96(5):1641-6.
- (103) Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1999 February;33(2):556-64.
- (104) Quireze C, Montero EF, Leitao RM, Juliano Y, Fagundes DJ, Poli-de-Figueiredo LF. Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Invest Surg* 2006 July;19(4):229-36.
- (105) Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006 November;17(11):3115-23.
- (106) Abrahao MS, Montero EF, Junqueira VB, Giavarotti L, Juliano Y, Fagundes DJ. Biochemical and morphological evaluation of ischemia-reperfusion injury in rat small bowel modulated by ischemic preconditioning. *Transplant Proc* 2004 May;36(4):860-2.

- (107) Welborn MB, III, Douglas WG, Abouhamze Z et al. Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. *Shock* 1996 September;6(3):171-6.
- (108) Welborn MB, III, Moldawer LL, Seeger JM, Minter RM, Huber TS. Role of endogenous interleukin-10 in local and distant organ injury after visceral ischemia-reperfusion. *Shock* 2003 July;20(1):35-40.
- (109) Mbachu EM, Klein LV, Rubin BB, Lindsay TF. A monoclonal antibody against cytokine-induced neutrophil chemoattractant attenuates injury in the small intestine in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2004 May;39(5):1104-11.
- (110) Harkin DW, Romaschin A, Taylor SM, Rubin BB, Lindsay TF. Complement C5a receptor antagonist attenuates multiple organ injury in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2004 January;39(1):196-206.
- (111) Lazaris AM, Maheras AN, Vasdekis SN et al. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach. *J Surg Res* 2009 June 15;154(2):267-73.
- (112) Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 1995 April;82(4):1026-60.
- (113) Perry MO. The hemodynamics of temporary abdominal aortic occlusion. *Ann Surg* 1968 August;168(2):193-200.
- (114) Reiz S, Peter T, Rais O. Hemodynamic and cardiometabolic effects of infrarenal aortic and common iliac artery declamping in man--an approach to optimal volume loading. *Acta Anaesthesiol Scand* 1979 December;23(6):579-86.
- (115) Roizen MF, Beaupre PN, Alpert RA et al. Monitoring with two-dimensional transesophageal echocardiography. Comparison of myocardial function in patients undergoing supraceliac, suprarenal-infraceliac, or infrarenal aortic occlusion. *J Vasc Surg* 1984 March;1(2):300-5.
- (116) Collange O, Fabienne T, Nathalie R et al. Pulmonary apoptosis after supraceliac aorta clamping in a rat model. *J Surg Res* 2005 December;129(2):190-5.
- (117) Jacome DT, Abrahao MS, Morello RJ, Martins JL, Medeiros AC, Montero EF. Different intervals of ischemic preconditioning on small bowel ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 2009 April;41(3):827-9.
- (118) Barbosa V, Sievers RE, Zaugg CE, Wolfe CL. Preconditioning ischemia time determines the degree of glycogen depletion and infarct size reduction in rat hearts. *Am Heart J* 1996 February;131(2):224-30.
- (119) Cai Z, Semenza GL. PTEN activity is modulated during ischemia and reperfusion: involvement in the induction and decay of preconditioning. *Circ Res* 2005 December 9;97(12):1351-9.

- (120) Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, Sievers RE, Wolfe CL. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo. *Circulation* 1997 September 2;96(5):1598-604.
- (121) Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Is this truly ischemic preconditioning? *Circ Res* 2006 August 18;99(4):e11.
- (122) Peralta C, Bulbena O, Xaus C et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002 April 27;73(8):1203-11.
- (123) Sawaya DE, Jr., Brown M, Minardi A et al. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1999 July;85(1):163-70.
- (124) Szijarto A, Hahn O, Lotz G, Schaff Z, Madarasz E, Kupcsulik PK. Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry. *J Surg Res* 2006 March;131(1):150-7.
- (125) Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004 September;49(9):1359-77.
- (126) Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc Res* 2004 February 15;61(3):591-9.
- (127) Konstantinov IE, Arab S, Li J et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005 November;130(5):1326-32.
- (128) Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 2002 August 15;55(3):590-601.
- (129) Moses MA, Addison PD, Neligan PC et al. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 February;288(2):H559-H567.
- (130) Zhang SZ, Wang NF, Xu J et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology* 2006 September;105(3):550-6.
- (131) Chen YS, Chien CT, Ma MC et al. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J Surg Res* 2005 June 1;126(1):92-101.
- (132) Falk JL, Rackow EC, Blumenberg R, Gelfand M, Fein IA. Hemodynamic and metabolic effects of abdominal aortic crossclamping. *Am J Surg* 1981 August;142(2):174-7.

- (133) Eide TO, Aasland J, Romundstad P et al. Changes in hemodynamics and acid-base balance during cross-clamping of the descending thoracic aorta. A study in patients operated on for thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm. *Eur Surg Res* 2005 November;37(6):330-4.
- (134) Poli de Figueiredo LF, Mathru M, Tao W, Solanki D, Uchida T, Kramer GC. Hemodynamic effects of isovolemic hemodilution during descending thoracic aortic cross clamping and lower torso reperfusion. *Surgery* 1997 July;122(1):32-8.
- (135) Wu X, Siegemund M, Seeberger M, Studer W. Systemic and mesenteric hemodynamics, metabolism, and intestinal tonometry in a rat model of supraceliac aortic cross-clamping and declamping. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1999 December;13(6):707-14.
- (136) Knudsen F, Andersen PT, Nielsen LK, Jersild C. Complement and leukocyte changes during major vascular surgery. *J Cardiothorac Anesth* 1988 October;2(5):646-9.
- (137) Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004 September;49(9):1359-77.
- (138) Haglund U. Gut ischaemia. Gut 1994 January;35(1 Suppl):S73-S76.
- (139) Sileri P, Sica G, Gentileschi P et al. Ischemic preconditioning protects intestine from prolonged ischemia. *Transplant Proc* 2004 March;36(2):283-5.
- (140) Moore-Olufemi SD, Kozar RA, Moore FA et al. Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2005 March;23(3):258-63.
- (141) Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970 October;101(4):478-83.
- (142) Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990 May;107(5):574-80.
- (143) Harkin DW, D'Sa AA, Yassin MM, Hoper M, Halliday MI. Gut mucosal injury is attenuated by recombinant bactericidal/permeability-increasing protein in hind limb ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2001 May;15(3):326-31.
- (144) Thompson JS, Bragg LE, West WW. Serum enzyme levels during intestinal ischemia. *Ann Surg* 1990 March;211(3):369-73.
- (145) Sola A, De OJ, Gonzalez R et al. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg* 2001 July;234(1):98-106.
- (146) Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg* 2005 September;92(9):1169-76.

- (147) Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB, Padovani CR. Systemic evaluation on ischemia and reperfusion injury of splanchnic organs in rats. *Acta Cir Bras* 2009 July;24(4):290-5.
- (148) Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986 October;251(4 Pt 1):G567-G574.
- (149) Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res* 1990 May;66(5):1436-44.
- (150) Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983 May;67(5):1016-23.
- (151) Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989 March;256(3 Pt 2):H789-H793.
- (152) Dreyer WJ, Michael LH, West MS et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991 July;84(1):400-11.
- (153) von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Twostep model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 September 1;88(17):7538-42.
- (154) Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* 2008 January;172(1):1-7.
- (155) Firrell JC, Lipowsky HH. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am J Physiol* 1989 June;256(6 Pt 2):H1667-H1674.
- (156) Ley K, Gaehtgens P. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res* 1991 October;69(4):1034-41.
- (157) Kubes P. The role of shear forces in ischemia/reperfusion-induced neutrophil rolling and adhesion. *J Leukoc Biol* 1997 October;62(4):458-64.
- (158) Kubes P. The complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002 April;14(2):65-72.
- (159) Alon R, Ley K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 2008 October;20(5):525-32.
- (160) Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991 May 31;65(5):859-73.

- (161) Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest* 1993 December;92(6):2719-30.
- (162) Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 1993 August 15;82(4):1308-16.
- (163) Olofsson AM, Arfors KE, Ramezani L, Wolitzky BA, Butcher EC, von Andrian UH. E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood* 1994 October 15;84(8):2749-58.
- (164) Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ et al. Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 1988 November;82(5):1746-56.
- (165) Lauterbach M, O'Donnell P, Asano K, Mayadas TN. Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. *J Leukoc Biol* 2008 June;83(6):1423-30.
- (166) Kubes P, Payne D, Ostrovsky L. Preconditioning and adenosine in I/R-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 1998 April;274(4 Pt 2):H1230-H1238.
- (167) Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S, Granger DN. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol* 1997 December;273(6 Pt 1):G1326-G1332.
- (168) Russell J, Epstein CJ, Grisham MB, Alexander JS, Yeh KY, Granger DN. Regulation of Eselectin expression in postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 June;278(6):G878-G885.
- (169) Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 1996 December;79(6):1196-204.
- (170) Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K. Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol* 2000 March 15;164(6):3301-8.
- (171) Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte adhesion and emigration. *Am J Physiol* 1996 November;271(5 Pt 2):H2052-H2059.
- (172) Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte--endothelial cell interactions: role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J* 2006 August;70(8):1070-5.
- (173) Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol* 1999 December;277(6 Pt 2):H2476-H2481.
- (174) Kubes P, Kerfoot SM. Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. *News Physiol Sci* 2001 April;16:76-80.

- (175) Beauchamp P, Richard V, Tamion F et al. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation* 1999 August 3;100(5):541-6.
- (176) Walsh SR, Tang TY, Sadat U, Gaunt ME. Remote ischemic preconditioning in major vascular surgery. *J Vasc Surg* 2009 January;49(1):240-3.
- (177) Kharbanda RK, Peters M, Walton B et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation* 2001 March 27;103(12):1624-30.
- (178) Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002 December 3;106(23):2881-3.
- (179) Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003 December;238(6):843-50.
- (180) Nuzzo G, Giuliante F, Vellone M et al. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 2004 February;10(2 Suppl 1):S53-S57.
- (181) Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoraki K et al. Ischemic preconditioning confers antiapoptotic protection during major hepatectomies performed under combined inflow and outflow exclusion of the liver. A randomized clinical trial. *World J Surg* 2009 September;33(9):1909-15.
- (182) Azoulay D, Lucidi V, Andreani P et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg* 2006 February;202(2):203-11.
- (183) Koneru B, Fisher A, He Y et al. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl* 2005 February;11(2):196-202.
- (184) Cescon M, Grazi GL, Grassi A et al. Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study. *Liver Transpl* 2006 April;12(4):628-35.
- (185) Amador A, Grande L, Marti J et al. Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Am J Transplant* 2007 September;7(9):2180-9.
- (186) Koneru B, Shareef A, Dikdan G et al. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant* 2007 December;7(12):2788-96.
- (187) Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002 January;11(1):43-8.

- (188) Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transpl Int* 2007 March;20(3):219-29.
- (189) Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005 April;140(4):405-9.
- (190) Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW, Jr., Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990 December;82(6):2044-51.
- (191) Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR. Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation* 2002 December 10;106(24):3091-6.
- (192) Tomai F, Crea F, Gaspardone A et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K+ channel blocker. *Circulation* 1994 August;90(2):700-5.
- (193) Edwards RJ, Redwood SR, Lambiase PD, Tomset E, Rakhit RD, Marber MS. Antiarrhythmic and anti-ischaemic effects of angina in patients with and without coronary collaterals. *Heart* 2002 December;88(6):604-10.
- (194) Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993 July 31;342(8866):276-7.
- (195) Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997 April;77(4):314-8.
- (196) Teoh LK, Grant R, Hulf JA, Pugsley WB, Yellon DM. The effect of preconditioning (ischemic and pharmacological) on myocardial necrosis following coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Res* 2002 January;53(1):175-80.
- (197) Wu ZK, Tarkka MR, Pehkonen E, Kaukinen L, Honkonen EL, Kaukinen S. Ischaemic preconditioning has a beneficial effect on left ventricular haemodynamic function after a coronary artery biopass grafting operation. *Scand Cardiovasc J* 2000 June;34(3):247-53.
- (198) Codispoti M, Sundaramoorthi T, Saad RA, Reid A, Sinclair C, Mankad P. Optimal myocardial protection strategy for coronary artery bypass grafting without cardioplegia: prospective randomised trial. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2006 June;5(3):217-21.
- (199) Ji B, Liu M, Liu J et al. Evaluation by cardiac troponin I: the effect of ischemic preconditioning as an adjunct to intermittent blood cardioplegia on coronary artery bypass grafting. *J Card Surg* 2007 September;22(5):394-400.
- (200) Gunaydin B, Cakici I, Soncul H et al. Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res* 2000 April;41(4):493-6.

- (201) Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007 August 18;370(9587):575-9.
- (202) Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 2006 June 6;47(11):2277-82.
- (203) Hoole SP, Heck PM, Sharples L et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation* 2009 February 17;119(6):820-7.
- (204) Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007 September 11;116(11 Suppl):198-105.
- (205) Gertler JP, Cambria RP, Brewster DC et al. Coagulation changes during thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 1996 December;24(6):936-43.
- (206) Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, Opal S, Redl H, van der PT. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock* 2005 December;24 Suppl 1:1-6.
- (207) Contopoulos-Ioannidis DG, Ntzani E, Ioannidis JP. Translation of highly promising basic science research into clinical applications. *Am J Med* 2003 April 15;114(6):477-84.

ABSTRACT

Erling Jr, N. Endothelial dysfunction on mesentery microcirculation caused by ischemia and reperfusion injury of supraceliac aortic clamping and the protective effect of local and remote ischemic preconditioning [thesis]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo; 2010. 116p.

INTRODUCTION: Supraceliac aortic clamping in major vascular procedures causes splanchnic ischemia and reperfusion (I/R) injury that may induce endothelial dysfunction, widespread inflammation, multiple organ dysfunction, and death. OBJECTIVES: Test the hypothesis that local or ischemic preconditioning (IPC) may be protective against I/R injury after supraceliac aortic clamping through the modulation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions, evaluated with intravital microscopy and expression of adhesion molecules, and also evaluate the hemodynamic, laboratorial, and intestinal histopathological changes related to these interventions. MATERIAL AND METHODS: Fifth six male EPM-1 Wistar rats, weighting 190 to 250 g, were divided into 4 groups: Control: (n=14) Sham surgery without aortic clamping; I-R: (n=14) Supraceliac aortic clamping for 20 min, followed by 120 min of reperfusion; PCI-L: (n=14) Local IPC through supraceliac aortic clamping for 2 cycles of 5 min of ischemia and 5 min of reperfusion, followed by the same protocol of I-R group; PCI-R: (n=14) Remote IPC through infrarenal aortic clamping for 2 cycle of 10 min of ischemia and 10 min of reperfusion, followed by the same protocol of I-R group. Seven animals per group were used to evaluate in-vivo leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules with intravital microscopy. Another 7 animals per group were used to collect mesentery samples for immunohistochemistry demonstration of adhesion molecules expression, and provide further tissues used in this study. RESULTS: Supraceliac aortic clamping increased the number of rolling leukocyte, and decrease the rolling velocity, increased the number of adherent leukocyte to venular surface, and migrated to interstitium. The expression of P-selectin, E-selectin, and ICAM-1 were increased in this group. The local or remote IPC reduced the leukocyte recruitment in-vivo and normalized the expression of adhesion molecules. The supraceliac aortic clamping also caused intense laboratorial changes and severe intestinal injury with loss of villus height and crypt depth. Local or remote IPC attenuate laboratorial changes and minimized the intensity of intestinal injury. CONCLUSIONS: Local or remote IPC reduce endothelial dysfunction on mesenteric microcirculation caused by I/R injury following supraceliac aortic clamping, and minimize tissue injury to intestinal mucosa.

APÊNDICE 1



Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo

> São Paulo, 21 de julho de 2006 **CEP 1016/06**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) NILON ERLING JUNIOR

Co-Investigadores: Luiz Francisco Poli de Figueiredo (Orientador) , Edna Frasson de Souza Montero, Paulina

Disciplina/Departamento: Cirurgia Vascular/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Pré-condicionamento isquêmico na modulação da interação leucócitoendotélio e lesão de isquemia-reperfusão induzida pelo pinçamento da aorta supra-celíaca".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental, agudo, de categoria C utilizando ratos Wistar. RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: O projeto visa testar a hipótese de que o pré-condicionamento isquêmico multi-visceral e remoto reduz a resposta inflamatória local e sistêmica causada pela isquemia e reperfusão do pinçamento da aorta supra-celíaca

RESUMO: Serão utilizados 133 ratos da linhagem EPM - 1 Wistar, adultos, provenientes da CEDEME. Os animais serão transferidos para os biotérios da Disciplina de Tecnica Operatória ou ao Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da USP. Haverá um período de 3 dias de adptação ao novo ambiente, quando então os animais serão manipulados de acordo com as diretrizes da National Research Council, para o cuidado e manipulação de animais de laboratório. Os animais serão submetidos à anestesia geral com pentobarbital sódico, V.I. e divididos em quatro grupos: 1- animais submetidos a pinçamento aórtico com pré-condicionamento isquêmico (PCI) remoto; pinçamento aórtico com PCI multi-visceral, pinçamento aórtico sem PCI e grupo controle. Será realizada avaliação da interação leocócito-endotélio por microscopia intra-vitral em preparação mesentérica e será avaliada a expressão de moléculas de adesão no mesentério, fígado e pulmão. Serão mensuradas as concentrações séricas e no lavabo bronco alveolar e será realizao a análise histológica morfométrica com estudo imunohistoquímico para apoptose em peças de figado pulmão e intestino. O método de eutanásia utilizado será a exsanguinação sob anestesia.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O projeto visa testar a hipótese de que o pré-condicionamento isquêmico multivisceral e remoto reduz a resposta inflamatória local e sistêmica causada pela isquemia e reperfusão do pinçamento da aorta supra-cellaca em ratos...

MATERIAL E MÉTODO: Foram adequadamente descritos os procedimentos e metodologia.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Projeto patrocinado pela FAPESP (R\$. 21.633,00).

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 16/07/2007 e 10/07/2008.

- O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.
- 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
- 2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
- 3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Recomendação: Apresentar a aprovação do projeto na FAPESP junto com o primeiro relatório parcial do trabalho

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

APÊNDICE 2



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Avenida Dr. Arnaldo, 455 — CEP 01246-903 Caixa Postal 54199 — São Paulo — SP

São Paulo, 4 de Julho, 2006.

Ao Comitê de Ética e Pesquisa UNIFESP / EPM

Ref: Declaração de Concordância

Prezados Professores

Declaramos que parte do estudo intitulado "Pré-condicionamento isquêmico na modulação da interação leucócito-endotélio e lesão de isquemia-reperfusão induzida pelo pinçamento da aorta supra-celíaca", será realizado em nosso Laboratório de Investigação Médica – LIM11.

Este estudo é a Tese de Doutorado do Dr. Nilon Erling Jr, matriculado no Curso de Pós-graduação em Cirurgia Cardiovascular da UNIFESP/EPM, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo.

Em nosso LIM-11 serão realizadas a microscopia intra-vital e dosagem de citocinas no sangue e no lavado bronco-alveolar. Trata-se de uma parceria de grande interesse dentro de nossa linha de pesquisa.

Estamos a disposição para eventuais esclarecimentos adicionais que se façam necessários.

Atenciosamente,

Prof. Martició Rochae Silva of. Tighar Depto. Cardiopenumologia,

L. Wings, Commercial Strains of S

APÊNDICE 3

Submission Confirmation

The Journal of Vascular Surgery <JVASCSURG@vascularsociety.org>

12 de março de 2010 15:31

Para: nilonjr@gmail.com

Dear Dr. Erling Jr.:

Thank you for submitting your manuscript "MICROCIRCULATORY EFFECTS OF LOCAL AND REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING IN SUPRACELIAC AORTIC CLAMPING. AN INTRAVITAL MICROSPCPIC STUDY" for consideration for publication in the Journal of Vascular Surgery. The manuscript has been properly entered into Editorial Manager, our Web-based manuscript submission and review software. This system also allows you to track the progress of your manuscript through the review process. To do this, login to Editorial Manager as an Author and select your manuscript.

Editorial Manager Web site for the Journal of Vascular Surgery is located at http://JVS.editorialmanager.com. As a reminder, your user name and confidential password, which you need to access Editorial Manager, are:

Username: nilonjr Password: xxxxxxx

We will contact you again when an initial editorial decision has been made regarding your manuscript. If you have any questions, please contact us at JVASCSURG@vascularsociety.org

Sincerely yours,

Jessica Brabant Managing Editor

YOUR SUBMISSION

30 de maio de 2010 16:10

The Journal of Vascular Surgery < jvascsurg@vascularsociety.org>

Para: "Nilon Erling Jr." <nilonjr@gmail.com>

Dear Dr. Erling Jr.:

I am pleased to inform you that your manuscript "MICROCIRCULATORY EFFECTS OF LOCAL AND REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING IN SUPRACELIAC AORTIC CLAMPING," Manuscript Number JVS-D-10-00314R2 has been accepted for publication in the Journal of Vascular Surgery. Thank you for making the suggested changes in your revised submission.

In order to publish your manuscript in a timely fashion, it is critical that your figures are in the correct format and resolution. Hopefully, your figures have received a "Pass" in the electronic figure checker during submission. If not, the publisher or editorial office may contact you later with a request for new electronic figures of a higher resolution; please provide these if possible within 7 days of request to avoid delays in the publication of your manuscript. Unless otherwise notified, we do not require hard copies of figures. If you have any questions about your figures, please contact the journal office via return email.

All electronic figures must be created according to the following criteria in order to be suitable for print publication: 300 DPI resolution at 3 inches (18 picas) in width.

Copyright transfer forms are collected by the publisher. They will contact you and send you a form to sign. Please return it promptly.

You will receive galley proofs from the publisher via e-mail in due course. They will be enclosed with your e-mail in PDF format. You will not receive paper proofs, so you must read the PDF proof and respond to the e-mail from the publisher to make your corrections. Please return proofs immediately and limit your changes to minor editorial or typesetting corrections. The precise issue in which your manuscript will appear is not established; however, it likely will appear in the "preview upcoming articles" section on the web (www.jvascsurg.org) prior to publication in print.

Your continued interest in the Journal of Vascular Surgery is appreciated.

Sincerely yours,

Louis M. Messina, M.D. Editor

ARTICLE IN PRESS

Microcirculatory effects of local and remote ischemic preconditioning in supraceliac aortic clamping

Nilon Erling Jr, MD,^a Naomi Kondo Nakagawa, PhD,^b José Walber Miranda Costa Cruz, PhD,^b Fernando Luiz Zanoni, MVD,^b José Carlos Costa Baptista-Silva, MD,^a Paulina Sannomiya, PhD,^b and Luiz Francisco Poli-de-Figueiredo, MD,^c São Paulo, SP, Brazil

Introduction: Supraceliac aortic clamping in major vascular procedures promotes splanchnic ischemia and reperfusion (I/R) injury that may induce endothelial dysfunction, widespread inflammation, multiorgan dysfunction, and death. We tested the hypothesis that local or remote ischemic preconditioning (IPC) may be protective against injury after supraceliac aortic clamping through the modulation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions, as evaluated with intravital microscopy and expression of adhesion molecules.

Methods: Fifty-six male Wistar rats (weight, 190 to 250 g), were divided into four groups of 14 rats each: control—sham surgery without aortic occlusion; I/R through supraceliac aortic occlusion for 20 minutes, followed by 120 minutes of reperfusion; local IPC through supraceliac aortic occlusion for two cycles of 5 minutes of ischemia and 5 minutes of reperfusion, followed by the same protocol of the IR group; remote IPC through infrarenal aortic occlusion for two cycles of 10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion, followed by the same protocol of IR group. Seven animals per group were used to evaluate in vivo leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules with intravital microscopy and another seven animals per group were used to collect mesentery samples for immunohistochemistry demonstration of adhesion molecules expression.

Results: Supraceliac aortic occlusion increased the number of rolling leukocytes with slower velocities and increased the number of adherent leukocytes to the venular surface and leukocyte migration to the interstitium. The expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 were also increased significantly after I/R. Local or remote IPC reduced the leukocyte recruitment in vivo and normalized the expression of adhesion molecules.

Conclusions: Local or remote IPC reduces endothelial dysfunction on mesenteric microcirculation caused by I/R injury after supraceliac aortic clamping. (J Vasc Surg 2010; ======.)

Clinical Relevance: The present study demonstrates that ischemia and reperfusion injury induced by supraceliac aortic occlusion promotes endothelial dysfunction and leukocyte recruitment on mesenteric microcirculation. Local and remote preconditioning reduced leukocyte-endothelial interactions and normalized the expression of endothelial adhesion molecules involved in this process. Although we recognize the limitation of an experimental model, our findings suggest that local and remote ischemic preconditioning minimize the endothelial dysfunction and leukocyte recruitment events that play a central role in systemic inflammation and multiorgan dysfunction after major aortic reconstructions.

Acute tissue ischemia has been recognized as a major cause of morbidity and mortality in patients who require supraceliac aortic clamping. Reperfusion, despite being essential to retain organ integrity, is also distinguished as a damaging process that magnifies the initial ischemic insult and results in widespread inflammation and multiorgan dysfunction.

From the Department of Surgery, Federal University of São Paulo, ^a Institute of Heart (InCor), LIM 11, University of São Paulo Medical School, ^b Department of Surgery, LIM 26, University of São Paulo Medical School, ^c

Supported by a grant from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 04/15964-6.

Competition of interest: none.

Reprint requests: Nilon Erling Jr, Rua Casemiro de Abreu, 908/202, 90420-000 Porto Alegre-RS, Brazil (e-mail: nilonjr@gmail.com).

The editors and reviewers of this article have no relevant financial relationships to disclose per the JVS policy that requires reviewers to decline review of any manuscript for which they may have a competition of interest.

0741-5214/\$36.00

Copyright © 2010 by the Society for Vascular Surgery. doi:10.1016/j.jvs.2010.05.120

The pathophysiology of ischemia and reperfusion (I/R) injury is complex. Different pathways converge to microcirculatory derangements and acute inflammatory reactions¹ through the recruitment of circulating leukocytes in a multistep process within the postcapillary venules.² The activated endothelial cells promote leukocyte rolling and subsequent adhesion mediated largely by means of P- and E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), respectively.³ The rolling and adhesion are fundamental steps for the leukocyte transmigration and the amplification of inflammatory response.⁴,⁵ The I/R injury affects leukocyte behavior, observed in intravital microscopy preparations and increases the expression of endothelial adhesion molecules.³,6

One of the most studied forms to mitigate the I/R injury is ischemic preconditioning (IPC). It consists of brief periods of ischemia and reperfusion before the more prolonged transient ischemia. In its classic form, the preconditioning stimulus is applied directly to the same tissue that will sustain the I/R lesion.⁷ Another way in which IPC can

JOURNAL OF VASCULAR SURGERY

■ 2010

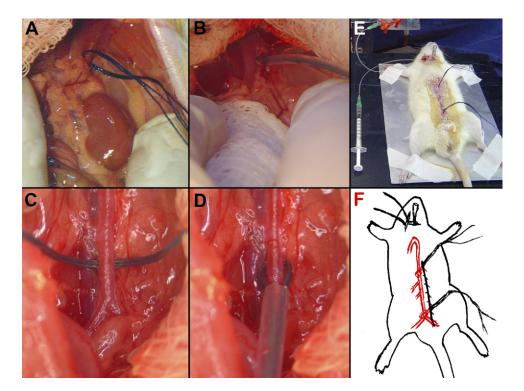


Fig 1. Dissection of abdominal aorta: (A) Supraceliac aortic control, for (B) tourniquet formation, and (C) infrarenal aortic control, for (D) tourniquet formation. E, During the experiment, the animal was placed on a heated platform. F, Illustration shows the final aspect of surgical preparation with the abdominal wall closed and Rumel tourniquets brought out of the wound to allow aortic occlusion and release without mesentery exposure.

be achieved is for the preconditioning stimulus to be applied in a distant tissue within the same⁸ or in a different organ.⁹ These IPC maneuvers, either local or remote, are particularly applicable to surgical patients who will undergo invasive or open surgical interventions.¹⁰

Compromise of mesentery perfusion has been implicated as a central event in multiorgan dysfunction after sepsis and in different shock status. ^{11,12} The microcirculatory effects of multivisceral I/R due to aortic cross-clamping are not clear, and the effects of IPC to mesentery microcirculation in this setting are not defined. The aim of this study was to test the hypothesis that local or remote IPC may provide protection against I/R injury in rats undergoing supraceliac aortic occlusion through the modulation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions evaluated with intravital microscopy and expression of adhesion molecules.

MATERIAL AND METHODS

2 Erling et al

The experimental protocol in this study was approved by the Ethical Committee of Federal University of São Paulo and was performed according to National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.*

Animal model and surgical preparation. Fifty-six male Wistar rats (weight, 190-250 grams) were fasted overnight before the procedure, with free access to water.

Anesthesia was induced with intraperitoneal sodium pentobarbital (50 mg/kg). Through a right anterior cervical incision, a tracheostomy was performed to allow airway control, spontaneous breathing, and secretions removal. The common carotid artery and external jugular vein were dissected and cannulated with polyethylene catheters. Venous access was used to inject solutions. Arterial access was used to monitor mean arterial pressure (MAP; MP 100, Biopac System Inc, Goleta, Calif).

Through a midline abdominal incision, the aorta was dissected and controlled proximally at the supraceliac portion between the diaphragmatic crura (Fig 1, A) and distally at the aortic bifurcation (Fig 1, C). The strings of the aortic control were used to create a 4-cm-long Rumel tourniquet (Fig 1, B and D). The abdominal wall was sutured, and these tourniquets were exteriorized at the top and at the bottom of the wound to allow aorta occlusion and release during the experiment (Fig 1, E and F). The abdominal wall was closed to reduce ambient exposure and manipulation of the mesentery to minimize basal inflammation, which could bias our results. The aortic occlusion and release necessary in some experimental groups was confirmed by an abrupt rise and fall of the MAP. Heparin was administered intravenously (100 IU/kg), and the animals were kept warm during the experiment with a heated platform set to 98.6°F on top of which a metallic plate was placed with the animal laying on it.

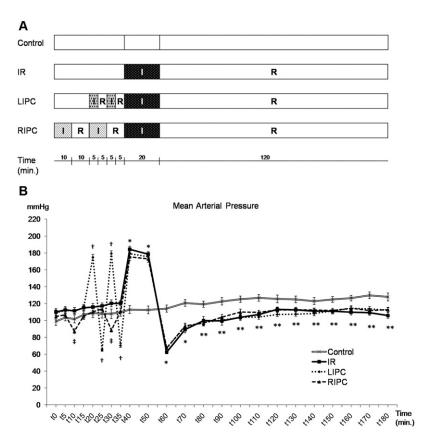


Fig 2. A, Experimental protocol and (B) main arterial pressure variations during the experiment in control, ischemia and reperfusion (IR), local ischemic preconditioning (LIPC), and remote ischemic preconditioning (RIPC) groups. Data expressed as mean \pm standard error for 14 animals per group. *P < .001: IR, LIPC, and RIPC vs control. $\dagger P < .001$: LIPC vs control. $\dagger P < .001$: LIPC vs control. $\dagger P < .001$: RIPC vs control.

Experimental design and study groups. After the same initial surgical preparation and stabilization, the animals were allocated into four experimental groups according to the duration of I/R. The control group was kept at rest during the entire experiment, without aortic occlusion. The IR group underwent 20 minutes of supraceliac aortic occlusion, followed by 120 minutes of reperfusion. The local IPC group (LIPC) underwent two cycles of supraceliac occlusion (5 minutes of ischemia and 5 minutes of reperfusion), followed by 20 minutes of supraceliac aortic occlusion and 120 minutes of reperfusion. The remote IPC (RIPC) group underwent two cycles of infrarenal occlusion (10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion), followed by 20 minutes of supraceliac aortic occlusion and 120 minutes of reperfusion (Fig 2, A). Seven animals from each group were used for intravital microscopy study and another seven for immunohistochemistry analysis.

The hemodynamic stability at the supraceliac clamp opening (occluded for 20 minutes) was accomplished by an infusion of 1.5 mL of saline 0.9%. Subsequent doses of 0.5 mL of saline 0.9% were administered after 30, 60, 90, and 120 minutes of reperfusion. This volume expansion was provided at the same time for all four groups. At the end of

the experiment, the animals were exsanguinated by aortic puncture.

Direct vital microscopy of mesenteric microcirculation. Microcirculatory blood flow as well as leukocyteendothelial cell interaction was evaluated through intravital microscopy at the end of the experiment (≤2 hours of reperfusion) by an independent investigator blinded to the study group. The previously sutured abdominal incision was opened and the mesentery was exposed for the in vivo examination. The animals were maintained on a special board warmed by circulating water at 37°C that also included a transparent platform on which the mesentery was positioned. During the period of intravital observation, the exposed mesentery surface was kept moist by continuously dripping warmed (37°C) Krebs-Henseleit solution (113 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂. 2H₂O, 25 mmol/L NaHCO₃, 1.1 mmol/L MgSO₄, 1.1 mmol/L KH₂PO₄, and 5 mmol/L glucose, pH 7.20-7.40) saturated with a mixture of gases (95% N2 and 5% CO2) in attempt to sustain microcirculatory characteristics unchanged throughout the intravital microscopic analysis.

The mesenteric microcirculation was assessed after 10 minutes of stabilization. Three to five postcapillary venules

JOURNAL OF VASCULAR SURGERY

4 Erling et al ■ 2010

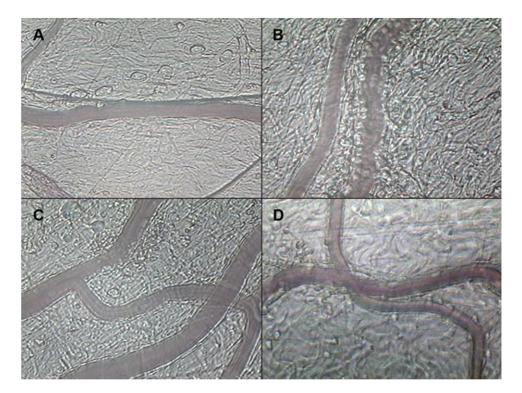


Fig 3. Representative intravital photomicrographs of mesenteric postcapillary venules (original magnification $\times 100$) from (A) control, (B) ischemia and reperfusion (I/R), (C) local ischemic preconditioning (LIPC), and (D) remote ischemic preconditioning (RIPC) groups.

(diameter 15-25 μm) with corresponding adjacent interstitium were selected for each animal (Fig 3). A charge-coupled device color camera (TK-C1380U, JVC Co, To-kyo, Japan) was incorporated to a trinocular microscope (Axioplan 2; Carl Zeiss Co, München-Hallbergmoos, Germany) to facilitate the observation of the enlarged image (original magnification $\times 425$) on a microcomputer monitor (SyncMaster 753DFX; Samsung, Manaus, MA, Brazil). Analyses of leukocyte-endothelium interactions were performed online by using Axiovision 4.1 image-computer software (Carl Zeiss Co) with an incorporated modulus of interactive measurements and time laps. Images were stored, enabling off-line playback analysis.

Leukocyte behavior

Rolling leukocytes. Rolling leukocytes were defined as white blood cells that moved significantly slower than the erythrocytes in a given microvessel. The number of rolling leukocytes was presented as the mean number of cells passing at a designated line perpendicular to the venular axis per 10 minutes. A given section of the vascular bed was tested only once. Three to five microvessels were randomly selected on a single animal to avoid improper sampling variability due to any flow disturbance. The individual value of a given animal for rolling leukocytes was the mean of these vessels observations (3, 4, or 5), and the final mean and standard error of this variable was derived from just one value for each animal. Individual leukocyte rolling velocity

was calculated from the time required for a steady rolling leukocyte to travel a defined distance in the microvessel.

Rolling velocity in each vessel was determined as the average velocity of 10 leukocytes. The same three to five microvessels were tested on a single animal to avoid improper sampling variability due to any flow disturbance. Individual value of a given animal for leukocyte rolling velocity was the mean of these vessels observations (3, 4 or 5), and the final mean and standard error of this variable was derived from just one value for each animal. Results are presented as micrometers per second.

Adherent leukocytes. A leukocyte was considered to be adherent to the venular endothelium if it remained stationary for more than 30 seconds. Adherent cells were counted during a 10-minute period in a 100-µm segment of the vessel. Three to five microvessels were randomly selected on a single animal to avoid improper sampling variability due to any flow disturbance. The individual value of a given animal for adherent leukocytes was the mean of these vessels observations (3, 4 or 5), and the final mean and standard error of this variable was derived from just one value for each animal.

Migrated leukocytes. The number of leukocytes accumulating at the connective tissue, randomly selected adjacent to the chosen postcapillary venule, was determined in a standard area of $5000 \ \mu m^2$. Three to five different fields were evaluated for each microvessel to avoid improper sampling variability due to any previous flow disturbance.

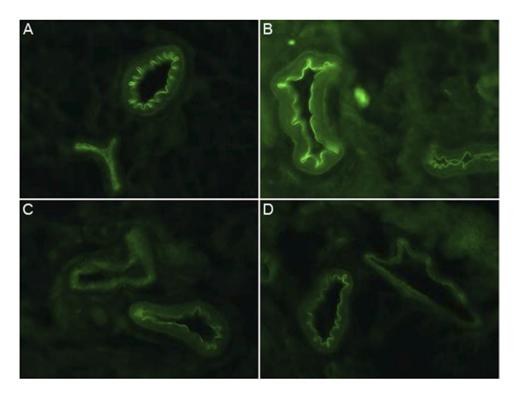


Fig 4. Representative photomicrographs of E-selectin immunofluorescence (original magnification $\times 1000$) from (A) control, (B) ischemia and reperfusion (I/R), (C) local ischemic preconditioning (LIPC), and (D) remote ischemic preconditioning (RIPC) groups.

The individual value of a given animal for migrated leukocytes was the mean of these field observations (3, 4, or 5), and the final mean and standard error of this variable was derived from just one value for each animal. Three to five microvessels were selected on a single animal to avoid sampling variability.

Immunohistochemistry. At the end of the experiment, animals were exsanguinated by aortic puncture. The mesentery was dissected from the intestines and immersed in hexane while freezing into liquid nitrogen. Immunohistochemistry was chosen to evaluate the expression of adhesions molecules and localize it in the mesenteric microvessel. An independent investigator blinded to the study group performed this analysis.

Serial 8-µm cryostat sections were adhered to glass slides previously coated with organosilane (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo). For the immunodetection of ICAM-1, P-selectin, and E-selectin (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, Calif), samples were fixed in acetone and exposed to 3% hydrogen peroxide. SuperBlock buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, Ill) was used to block nonspecific sites. Tissue sections were incubated overnight at 4°C with a biotin-conjugated antirat immunoglobulin G antibodies against ICAM-1, P-selectin, and E-selectin. All these antibodies were diluted 1:50 in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.3% Tween 20. After being rinsed in PBS three times for 10 minutes, sections were incubated with streptavidin-fluorescein (Amersham Pharmacia Bio-

tech, London, UK; diluted 1:200) for 1 hour at room temperature. Samples were washed three times with PBS were treated with Vectashield mounting medium containing propidium iodide (Vector Labs, Burlingame, Calif) to preserve the fluorescence (Fig 4). Negative control samples were incubated with PBS instead of the primary antibody. Analyses were performed by using Image-Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, Md), which measures the intensity levels of fluorescence within the image. Results are presented as mean fluorescence intensity in units.

Statistical analysis. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Paired-sample t test was used for repeated measurement variables. Multiple comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance, with post hoc analysis with Tukey, Tamhane, or Dunnett T3 tests, according to the Levene test of homogeneity of variance. Significance was set at P < .05.

RESULTS

Hemodynamic. At baseline, MAP was similar between groups (105.7 ± 1.9 mm Hg, P = .177). Supraceliac aortic occlusion always resulted in a significant MAP increase compared with baseline values, the preceding time, or the control group corresponding time (P < .001). Release of supraceliac aortic occlusion always caused a significant MAP decrease to values below the baseline or control group corresponding time (P < .001). Infrarenal

6 Erling et al JOURNAL OF VASCULAR SURGERY ■ 2010

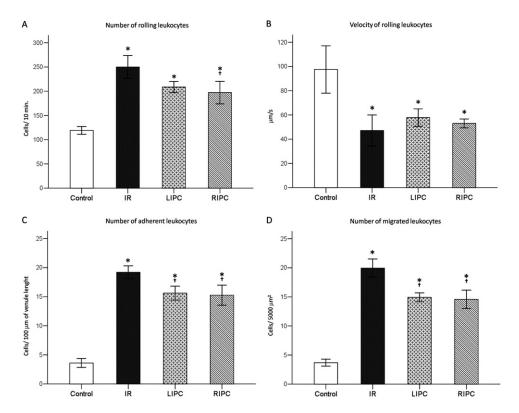


Fig 5. Mesenteric leukocyte-endothelium interaction. A, Number of rolling leukocytes, (B) velocity of rolling leukocytes, (C) number of adherent leukocytes, and (D) number of migrated leukocytes in control, ischemia and reperfusion (IR), local ischemic preconditioning (LIPC), and remote ischemic preconditioning (RIPC) groups. Data expressed as mean \pm standard error for seven animals per group. *P < .05 vs control. †P < .05 vs IR.

aortic occlusion in the group did not increase MAP, but release caused a transient significant decrease in MAP (P < .05; Fig 2, B).

Mesenteric leukocyte-endothelium interactions. The mean diameter of unbranched postcapillary venules was 18.44 ± 0.37 µm and did not differ among groups (P = .275). The number of leukocytes rolling along the endothelial surface was 119.14 ± 3.91 cells/10 minutes in control group. The IR group increased more than twofold in this number (250.11 \pm 11.85 cells/10 minutes, P <.001 vs control). The number of rolling leucocytes was raised in the LIPC, to 208.63 ± 5.84 cells/10 minutes (P < .001 vs control), and also in the RIPC group to $197.21 \pm 11.62 \text{ cells/}10 \text{ minutes } (P = .002 \text{ vs control}).$ Compared with the IR group, there was a significant reduction in the number of rolling leukocytes in the RIPC group (P = .046) but not in the LIPC group (P = .072; Fig 5, A). The leukocyte rolling velocity was $97.59 \pm 9.77 \,\mu\text{m/s}$ in the control group. In the other three groups, there were significant reductions of velocities compared with the control group (IR: $47.15 \pm 6.45 \, \mu \text{m/s}$, P = .008; LIPC: $57.83 \pm 3.60 \ \mu \text{m/s}, P = .033$; and RIPC: 53.03 ± 1.8 μ m/s, P = .021; Fig 5, B).

The number of adherent leukocytes was 3.60 ± 0.38 cells/100 μ m venule length in the control group. The IR group had more than a fivefold increase in this number

(19.20 ± 0.55 cells/100 μm venule length, P<.001). The LIPC and RIPC groups also raised the number of adherent leukocytes (LIPC: 15.63 ± 0.60 cells/100 μm venule length; RIPC: 15.26 ± 0.86 cells/100 μm venule length, both P<.001 vs control), but these boosts were significantly lower than the in IR group (P = .002 vs LIPC, and P = .001 vs RIPC; Fig 5, C). Leukocyte transmigration followed the same trend of leukocyte adherence. The number of migrated leukocytes was 3.67 ± 0.30 in controls, 19.96 ± 0.79 in IR, 14.92 ± 0.39 in LIPC, and 14.58 ± 0.79 cells/5000 μm² in RIPC. This phenomenon was significantly less intense in the control group than in the other groups (P<.001), and the number of migrated leukocytes in the LIPC and RIPC groups was significantly lower than in the IR group (P<.001; Fig 5, D).

Immunohistochemistry: Expression of P-selectin, E-selectin, and ICAM-1. Mesenteric expression of P-selectin almost doubled in the IR group compared with the control group $(5.44 \pm 0.69 \text{ vs } 2.84 \pm 0.36, P = .015)$. The fluorescence intensity of P-selectin was decreased in the LIPC (1.44 ± 0.29) and RIPC (1.33 ± 0.10) groups. These values were significantly lower than the IR group (P < .000) and were also lower than the control group (P = .012 vs LIPC, P = .003 vs RIPC; Fig 6, A). E-selectin expression was more than 2.6-fold more intense in the IR group than in the controls $(6.86 \pm 1.01 \text{ vs } 2.62 \pm 0.39,$

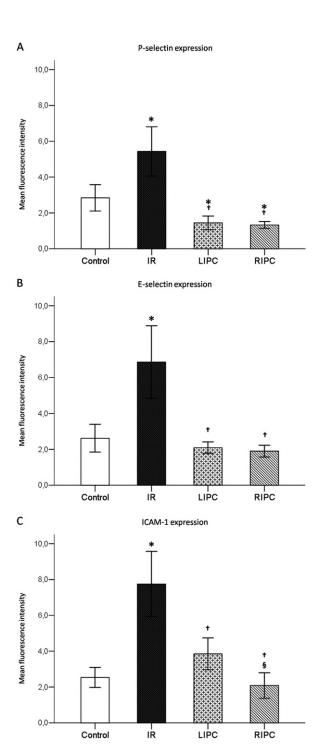


Fig 6. Expression of adhesion molecules **(A)** P-selectin, **(B)** E-selectin, and **(C)** intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM-1*) in mesenteric endothelium in control, ischemia and reperfusion (*IR*), local ischemic reperfusion (*LIPC*), and remote ischemic preconditioning (*RIPC*) groups. Data are expressed as mean \pm standard error for seven animals per group. *P < .02 vs control. †P < .005 vs IR. §P < .03 vs LIPC.

P=.009). In the LIPC and RIPC groups, this raise was abolished (2.09 \pm 0.16 and 1.90 \pm 0.16, respectively), rendering the fluorescence detection of E-selectin in these groups similar to the control group and significantly lower than the IR group (P<.005; Fig 6, B). ICAM-1 expression was amplified threefold in the IR group compared with the control group (7.75 ± 0.91 vs 2.53 ± 0.28 , P<.000). The LIPC and RIPC groups did not show increased expression of ICAM-1, and it was lower in both of these groups than in the IR group (P<.005). In RIPC group the down-expression ICAM-1 was more pronounced than LIPC (P=.022; Fig 6, C).

DISCUSSION

This study characterized the microcirculatory response to I/R injury and the effect of local and remote IPC caused by supraceliac aortic occlusion in a clinically relevant experimental model. I/R injury is an integrant part of major vascular procedures. Despite great advances in less invasive endovascular techniques, complex aneurysmal disease involving the visceral aorta still requires surgical intervention.¹³ Aortic occlusion at this level causes transient blood supply blockage to one or more visceral organs, and it is well recognized that this I/R injury is a very distressful situation. 14 Techniques used to decrease total ischemic time, such as distal aortic perfusion using left heart bypass, have proven to be effective in thoracoabdominal aortic aneurysm repair, 15,16 but morbidity and mortality of visceral aortic reconstruction remains high, especially if unselected data are considered.¹⁷ The principal finding of this study is that local and remote IPC reduce the inflammatory response of I/R injury, documented in vivo by the downregulation of the multistep process of leukocyte recruitment and also by the down-expression of endothelial adhesion molecules.

Microvascular dysfunction plays a central role in I/R injury and results from the amplified adhesive interactions between activated leukocytes and endothelial cells of post-capillary venules.² Different models of I/R injury demonstrated up-regulation of adhesion molecules P-selectin, E-selectin, and ICAM-1, ^{18,19} and the blockage or absence of one or more of these molecules causes a reduction of leukocyte accumulation. ²⁰

Our results demonstrated that isolated I/R injury increased the expression of P- and E-selectin. The IPC, either local or remote, conversely, led to a down-expression of these endothelial molecules. Interestingly, P-selectin expression in local or remote preconditioned animals was even lower than in controls. This finding, to some extent, contrasts with our intravital microscopic observations. The I/R injury increased the number of rolling leukocytes and decreased the rolling velocity, but the effect of local or remote IPC on that, despite being protective, was just marginally significant.

Supraceliac occlusion increased ICAM-1 expression, but not in preconditioned animals. The leukocyte behavior also follows this observation, with the more pronounced differences detected in the numbers of stickers and mi-

JOURNAL OF VASCULAR SURGERY

2010

grated leukocytes, with a fivefold to sixfold increase in animals that underwent I/R injury. Local and remote preconditioning again effectively decrease these steps of leukocyte recruitment.

8 Erling et al

Some human observations are already available. IPC has long been established to exist in humans. Local IPC was able to preserve endothelial function and modulated inflammatory cell recruitment in volunteers who underwent forearm I/R,²¹ what was later demonstrated to happen with contralateral arm (remote) IPC.²² In clinical observations, local IPC reduced troponin T release 72 hours after coronary arterial bypass grafting (CABG).²³ During percutaneous coronary intervention (PCI), local IPC resulted in less ST-segment elevation, chest pain severity, regional wall motion abnormalities, and diastolic abnormalities.²⁴ Despite promising results, studies of local IPC did not fully achieve usefulness in the field of aortic surgery.

The less invasive nature of remote IPC makes it more amenable for tests in different clinical scenarios. Children undergoing repair of congenital heart defects were randomized to receive remote IPC using a lower limb blood pressure cuff or control treatment, and there was a decrease in postoperative levels of troponin I and inotrope requirements.²⁵ Remote IPC using upper limb blood pressure cuff also had a positive effect in adult patients undergoing CABG, reducing the overall serum troponin T serum concentration up to 48 hours after surgery.²⁶ In patients with abdominal aortic aneurysm, remote IPC was evaluated with temporary iliac clamping before the aortic repair. 10 This randomized controlled trial demonstrated a reduction in renal impairment and myocardial injury and also in infarction in preconditioned patients independent of other clinical or surgical covariables. A recently randomized trial of 242 consecutive patients showed that remote IPC, through the inflation of an upper arm pressure cuff, decreased the troponin I concentration at 24 hours in elective PCI and decreased the major adverse cardiac and cerebrovascular events at 6 months.27

The modifications induced by local and remote IPC are not totally clear. It is recognized that IPC confers different phases of protection. The early phase is independent of protein synthesis, with post-translational modifications. The late phase, known as second window of protection (SWOP), is mediated by synthesis of new proteins due to an altered gene expression. ²⁸ Our model reproduces an acute situation like that of thoracoabdominal aortic repair, and it was not our intent to investigate the adaptive response of SWOP.

To our knowledge, this is the first investigation addressing microvascular dysfunction assessed with direct mesenteric intravital microscopy observation of leukocyte-endothelial interactions and evaluation of adhesion molecules expression in a proper model mimicking supraceliac aortic clamping to test the protective effect of local or remote preconditioning. In our experimental protocol, the I/R injury was achieved with 20-minute supraceliac occlusion, a period that allowed 120 minutes of reperfusion without death in our preliminary studies and was also

applied by others.²⁹ Considering the lack of robust evidence and agreement about the more appropriate times of multivisceral local IPC or muscular remote IPC for supraceliac aortic occlusion, we used the most common and accepted protocols applied for intestine,³⁰ liver,³¹ and skeletal muscle^{10,32,33} to respect individual organ susceptibility to I/R injury. For local IPC, the great sensitiveness of intestine to I/R injury led to two 5-minute ischemia and 5-minute reperfusion cycles. For remote IPC, the better resistance of skeletal muscle to I/R injury led to two 10-minute ischemia and 10 minute-reperfusion cycles.

Our experimental protocol has some limitations. We used healthy rats, without blood loss and fluid shifts that characterize aortic surgery in adults. Typically, cardiovascular, pulmonary, and renal dysfunctions are present in these patients and contribute substantially to the high rate of complications observed. Moreover, this is an acute protocol. Survival studies as well as larger animal models are needed to further evaluate organ dysfunction and long-term effects of the procedure. On the other hand, this well-standardized protocol allows us to demonstrate the effect of local and remote IPC on leukocyte-endothelial interactions with intravital microscopy that cannot be performed in humans. Our results support our hypothesis that IPC, either local or remote, may be beneficial to humans undergoing elective aortic repair.

CONCLUSIONS

Visceral and muscular ischemia caused by supraceliac aortic occlusion produces an intense inflammatory reaction in postischemic reperfused tissues. These changes modify leukocyte behavior and adhesion molecule expression. Local and remote IPC in this setting renders tissue more resistant to the deleterious effects of the prolonged I/R insult. Our study, in a proper model for aortic surgery, adds more evidence of the protective benefits of IPC. From a practical standpoint, these IPC maneuvers could be applied to humans, and this is particularly true for remote IPC, due to less risk of distal embolization from thrombus dislodgment or plaque fracture during arterial clamping, for example. Nevertheless, larger trials investigating IPC are still needed for a wider acceptance of this strategy to mitigate I/R injury and subsequent systemic inflammatory reaction as well as multiorgan dysfunction in major aortic surgery.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: NE, PS, PF Analysis and interpretation: NE, PS, PF Data collection: NE, NN,JC, FZ

Writing the article: NE

Critical revision of the article: NE, JB, PS, PF

Final approval of the article: NE, PF

Statistical analysis: NE Obtained funding: PF Overall responsibility: NE

ARTICLE IN PRESS

JOURNAL OF VASCULAR SURGERY Volume ■■, Number ■

Erling et al 9

REFERENCES

- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol 2000;190:255-66.
- Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. Am J Physiol 1989:257:G683-8.
- Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, et al. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. Circ Res 1994;74:336-43.
- Harlan JM, Winn RK. Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. Crit Care Med 2002;30(5 suppl):S214-9.
- Kubes P. The complexities of leukocyte recruitment. Semin Immunol 2002;14:65-72.
- Kubes P, Payne D, Ostrovsky L. Preconditioning and adenosine in I/R-induced leukocyte-endothelial cell interactions. Am J Physiol 1998;274:H1230-8.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74: 1124-36
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. Circulation 1993;87:893-9.
- Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. Circulation 1996;94:2193-200.
- Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. Circulation 2007;116(11 suppl):198-105.
- Yada-Langui MM, njos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. Exp Biol Med (Maywood) 2004;229:684-93.
- Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, Shiwa SR, Costa Cruz JW, Poli de Figueiredo LF, et al. Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery. Shock 2006;26:180-6.
- Jacobs MJ, Mommertz G, Koeppel TA, Langer S, Nijenhuis RJ, Mess WH, et al. Surgical repair of thoracoabdominal aortic aneurysms. J Cardiovasc Surg (Torino) 2007;48:49-58.
- Welborn MB, Oldenburg HS, Hess PJ, Huber TS, Martin TD, Rauwerda JA, et al. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. Crit Care Med 2000;28:3191-7.
- Safi HJ, Miller CC 3rd, Huynh TT, Estrera AL, Porat EE, Winnerkvist AN, et al. Distal aortic perfusion and cerebrospinal fluid drainage for thoracoabdominal and descending thoracic aortic repair: ten years of organ protection. Ann Surg 2003;238:372-80.
- Coselli JS, Bozinovski J, LeMaire SA. Open surgical repair of 2286 thoracoabdominal aortic aneurysms. Ann Thorac Surg 2007;83: S862-4.
- Rigberg DA, McGory ML, Zingmond DS, Maggard MA, Agustin M, Lawrence PF, et al. Thirty-day mortality statistics underestimate the risk of repair of thoracoabdominal aortic aneurysms: a statewide experience. J Vasc Surg 2006;43:217-22.

- Jones SP, Trocha SD, Strange MB, Granger DN, Kevil CG, Bullard DC, et al. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H2196-201.
- Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. Semin Immunol 2002;14:73-81.
- Kakkar AK, Lefer DJ. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. Curr Opin Pharmacol 2004;4:154-8.
- Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N, et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. Circulation 2001;103:1624-30.
- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. Circulation 2002;106:2881-3.
- Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. Heart 1997;77:314-8.
- Leesar MA, Stoddard MF, Xuan YT, Tang XL, Bolli R. Nonelectrocardiographic evidence that both ischemic preconditioning and adenosine preconditioning exist in humans. J Am Coll Cardiol 2003;42:437-45.
- Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. J Am Coll Cardiol 2006;47:2277-82.
- Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. Lancet 2007;370:575-9.
- Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) study: a prospective, randomized control trial. Circulation 2009;119:820-7.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. Heart Fail Rev 2007;12:181-8.
- Welborn MB 3rd, Moldawer LL, Seeger JM, Minter RM, Huber TS. Role of endogenous interleukin-10 in local and distant organ injury after visceral ischemia-reperfusion. Shock 2003;20:35-40.
- Desai KK, Dikdan GS, Shareef A, Koneru B. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation. Liver Transpl 2008;14:1569-77.
- Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci 2004;49:1359-77.
- 32. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. Cardiovasc Res 2002;55:590-601.
- Moses MA, Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Huang N, Zair M, et al. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H559-67.

Submitted Mar 15, 2010; accepted May 30, 2010.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. [banco de dados da internet] 2010. Disponível em http://decs.bvs.br/

Dicionário da lingual portuguesa [dicionário na Internet]. Melhoramentos; 1998-2007.

Disponível em: http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php

Elliott AC, Woodward WA. Statistical Analysis Quick Reference Guidebook: With SPSS Examples. Thousand Oaks, CA; 2006

Hebel R, Stromberg M W. Anatomy of the laboratory rat. Baltimore: Williams & Wilkins; 1976

Institute of Laboratory Animal Resources. Comission on Life Sciences. Guide for care and use of laboratory animal. *National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996. Available from: http://fermat.nap.edu/catalog/5140.html. Accessed on March 30, 2006

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a. ed ver. e amp. São Paulo; 2005.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de	Adm	<u>inis</u>	tra	ção

Baixar livros de Agronomia

Baixar livros de Arquitetura

Baixar livros de Artes

Baixar livros de Astronomia

Baixar livros de Biologia Geral

Baixar livros de Ciência da Computação

Baixar livros de Ciência da Informação

Baixar livros de Ciência Política

Baixar livros de Ciências da Saúde

Baixar livros de Comunicação

Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE

Baixar livros de Defesa civil

Baixar livros de Direito

Baixar livros de Direitos humanos

Baixar livros de Economia

Baixar livros de Economia Doméstica

Baixar livros de Educação

Baixar livros de Educação - Trânsito

Baixar livros de Educação Física

Baixar livros de Engenharia Aeroespacial

Baixar livros de Farmácia

Baixar livros de Filosofia

Baixar livros de Física

Baixar livros de Geociências

Baixar livros de Geografia

Baixar livros de História

Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura

Baixar livros de Literatura de Cordel

Baixar livros de Literatura Infantil

Baixar livros de Matemática

Baixar livros de Medicina

Baixar livros de Medicina Veterinária

Baixar livros de Meio Ambiente

Baixar livros de Meteorologia

Baixar Monografias e TCC

Baixar livros Multidisciplinar

Baixar livros de Música

Baixar livros de Psicologia

Baixar livros de Química

Baixar livros de Saúde Coletiva

Baixar livros de Serviço Social

Baixar livros de Sociologia

Baixar livros de Teologia

Baixar livros de Trabalho

Baixar livros de Turismo