EFEITO DO ALOPURINOL E DO PÓS CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO NO FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA DE MEMBROS POSTERIORES

Luana Lopes (BIC/Fundação Araucária), Rafael Inácio Brandão ,Filipe Silva Linhares, Ricardo Zanetti
Gomes, Katia Sabrina Paludo (Orientador), e-mail: katiapaludo@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética/SEBISA.

Área: Medicina/ Subárea: Clínica médica.

Palavras-chave: histologia, radicais livres, lesão hepática.

Resumo

Introdução: O traumatismo por reperfusão é um fenômeno durante o qual o dano celular em um órgão, causado pela hipóxia, é paradoxalmente exacerbado após a restauração da distribuição do oxigênio pelos oxirradicais. Como a distribuição é sistêmica podem ocorrer lesões em órgãos não isquemiados, como o fígado. Considerando isso, o objetivo desse trabalho foi de investigar o potencial efeito protetor do alopurinol e do pós condicionamento isquêmico no traumatismo por reperfusão. **Métodos:** Foi realizada isquemia através do clampeamento da artéria infra-renal em ratos da raça wistar e o fígado foi analisado em relação aos efeitos sistêmicos a partir da histologia. Os animais foram divididos em 5 grupos: SHAM, Reperfusão Única, Alopurinol/Reperfusão Única, Reperfusão Repetida e Alopurinol/Reperfusão Repetida. **Resultados e Conclusão:** Observamos que o grupo que passou pelo processo de isquemia apresentou lesão hepática com vacuolização e congestão quando comparado ao SHAM. Os grupos condicionados com reperfusão repetida apresentaram menores taxas de vacuolização quando comparados ao grupo de lesão (reperfusão única).

Introdução

A Isquemia é definida como a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos (PINHEIRO et al., 1999). A reperfusão, passo lógico para lidar com qualquer situação de isquemia, contraditoriamente, é a grande responsável pelas principais lesões nas células do órgão isquemiado e pode agravar o dano celular isquêmico levando a complicações sistêmicas como a síndrome da angústia respiratória do adulto, disfunções renais, hepáticas e ocasionalmente, até ao cenário da síndrome de disfunção sistêmica de múltiplos órgãos (MIRANDA et al., 2004). O alopurinol tem mostrado potencial terapêutico para a redução dos danos celulares secundários à isquemia seguida de reperfusão e por consequência, as suas repercussões (MESSIHA AND ABO-YOUSSEF, 2015). Outras técnicas como o pós-condicionamento isquêmico, que consiste em alguns ciclos de isquemia e reperfusão intercalados após o período de isquemia principal, foram aplicados com excelência em órgãos como o intestino, miocárdio e fígado. (PINHEIRO et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi empregar as abordagens do pós condicionamento isquêmico e do pré-tratamento com alopurinol na tentativa de reduzir as lesões de

isquemia/reperfusão de membros inferiores utilizando o fígado como alvo do estudo dos impactos sistêmicos desse evento.

Materiais e Métodos

Procedimento cirúrgico

Trinta ratos da raça Wistar foram aleatoriamente separados em 5 grupos: SHAM (A), Reperfusão Única (B), Alopurinol/Reperfusão Única (C), Reperfusão Repetida (D) e Alopurinol/Reperfusão Repetida (E). Todos os ratos foram anestesiados com 75 mg/Kg de Cetamina e 10 mg/Kg de Xilasina via intraperitoneal, com redoses a cada 30 min. Os animais foram submetidos a lapatoromia com exposição da cavidade abdominal com as alças intestinais tracionadas para fora dessa cavidade. No grupo A foi realizada a dissecção da artéria aorta, com os animais permanecendo em plano cirúrgico por duas horas. No B foi realizada a estenose da aorta por meio de clampes permanecendo em plano cirúrgico por duas horas. Os ratos do grupo C receberam, por gavagem, com sonda rígida, dose de 100mg/kg de alopurinol uma hora antes do procedimento cirúrgico e depois foram submetidos ao mesmo procedimento de estenose e reperfusão única, como o grupo B. No grupo D foi realizada a estenose da aorta infrarrenal por duas horas com posteriores três ciclos de estenose e reperfusão (2 minutos cada estenose e cada reperfusão). Os animais do grupo E receberam alopurinol como o grupo C, e, depois, foram submetidos ao mesmo procedimento de estenose e reperfusão, sendo a última fracionada. Após 72 horas todos os ratos foram anestesiados novamente e foi realizada punção da carótida com sangria branca e posterior coleta de órgãos para análise histológica. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da UEPG, 29/2015.

Processamento histológico e avaliação das alterações morfológicas

Os órgãos coletados seguindo procedimento do item anterior que se encontravam em álcool 70% desde a sua coleta e fixação com ALFAC foram processadas de acordo com a técnica histológica convencional. Os blocos de parafina foram seccionados com micrótomo em fatias de 5 μm de espessura, com intervalo de 50 μm entre os cortes, sendo dispostos 4 cortes por lâmina. Cada lâmina foi corada com hematoxilina e eosina. As alterações morfológicas foram observadas e identificadas em microscópio ótico com aumento de 100 e 400x, por avaliador cegado para os grupos.

Foram quantificados 10 campos por corte (40 campos por animal) pela atribuição de escores padronizados por Suzuki et al (1993) de 0 até 3, sendo 0 - ausência de alteração, 1 - leve alteração, 2 – alteração moderada e 3 – alteração severa. Foram consideradas alterações a presença de células inflamatórias, vacuolização, degeneração hidrópica, tumefação celular, alargamento de sinusoide, congestão vascular, infiltrado perivascular e necrose.

Resultados e Discussão

Conforme a Figura 1 podemos observar que em relação a presença de vacuolização, o grupo B apresentou valores significadamente maiores que o grupo A, o que demonstra lesão hepática indireta pelo processo de isquemia/reperfusão de aorta abdominal em ratos. E neste mesmo parâmetro os grupos E e D apresentaram menos vacuolização que o grupo B. Já o grupo tratado unicamente alopurinol não

apresentou resultados protetores, então, provavelmente, no grupo D a reperfusão repetida pode ter sido a abordagem mais eficiente que o alopurinol.

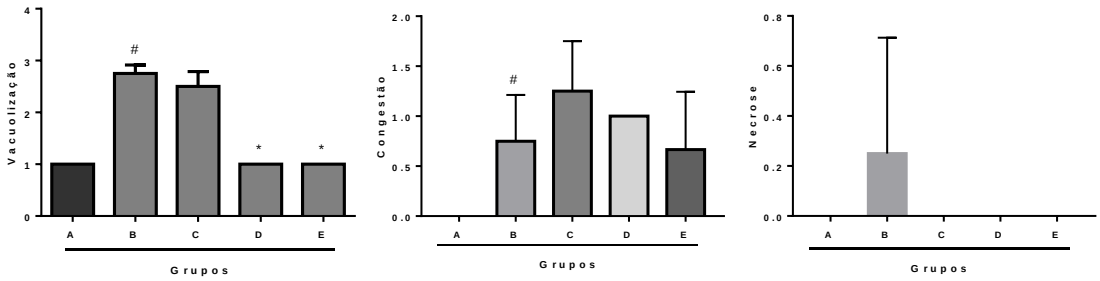


FIGURA 1 - Resultado da análise histológica dos graus de vacuolização, congestão e necrose, segundo a classificação de Suzuki e colaboradores (1993). Cada barra representa a mediana dos resultados obtidos (n = 5) + o desvio padrão. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. *p<0,05 em relação ao grupo B. #p<0,05 em relação ao grupo A. A – SHAM, B – reperfusão única, C – Alopurinol/Reperfusão única, D – Alopurinol/Reperfusão repetida, E – Reperfusão repetida.

O processo de congestão ocorre pela vasodilatação dos vasos hepáticos e o acúmulo de eritrócitos frente a um processo de lesão celular (DIDONE et al, 2002). No nosso estudo, conforme a Figura 1, podemos observar que o grupo Reperfusão Única apresentou congestão estatisticamente significante frente a não apresentação no grupo SHAM, o que novamente confirma que o nosso modelo induz alterações importantes em órgãos distantes da isquemia, mas nenhuma das abordagens empregadas reduziu estatisticamente a lesão nesse parâmetro.

Em relação a necrose não obtivemos resultados estatísticos significantes, nem mesmo para o grupo controle de reperfusão única, como mostra a Figura 1.

A isquemia seguida da reperfusão pode ser considerada um evento comum à diversas doenças da prática clínico-cirúrgica. As alterações celulares dos hepatócitos sujeitos a esse processo podem ser avaliadas histologicamente, como já demonstrado em outros estudos. O papel da lipoperoxidação de lipídios, assim como o papel dos radicais livres na lesão do fígado ainda é controverso. Mesmo assim, inibidores da xantina-oxidase dados no pré-operatório resultam em evidente efeito hepatoprotetor quando comparados aos animais controles, efeito que pode ser mais importante que os efeitos protetores de sequestradores de radicais livres dados no pré-operatório. (MIRANDA et al, 2004).

O alopurinol e seu metabólito ativo (aloxantina) são inibidores da enzima xantina-oxidase. Por conseguinte, este medicamento é uma possibilidade terapêutica para a redução dos danos secundários à Isquemia/Reperfusão, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, fazendo com que os danos a ao tecido hepático sejam reduzidos (COGHLAN ET AL, 1994). O pre-tratamento com o Alopurinol não foi capaz de inibir nenhum nem a vacuolização e nem a congestão observada no grupo B (controle de isquemia). A dose de tratamento utilizada está compatível com a de muitos trabalhos na literatura. Entretanto, o período de 72 horas após a isquemia pode ter sido curto para a visualização de melhores resultados.

Outra abordagem recente utilizada na terapêutica dos danos da isquemia/reperfusão é o pós-condicionamento isquêmico, também conhecido como reperfusão repetida, que consiste na realização de um ou mais ciclos curtos de reperfusão seguidos por um ou mais ciclos curtos de isquemia (ZHAO ET AL, 2003). O pós-condicionamento permite a oxigenação lenta e intermitente controlada através dos vários ciclos de isquemia antes da reperfusão permanente e atenua múltiplos gatilhos de lesão de reperfusão incluindo oxidantes, citocinas pró-inflamatórias, neutrófilos e reguladores pró-apoptóticos (CHEN ET AL 2015). Em nossos resultados pudemos perceber que a reperfusão repetida foi capaz de reduzir de maneira signifcativa a vacuolização dos hepatócidos, mas não a congestão.

Conclusões

Os animais que sofreram o processo de isquemia e reperfusão de aorta abdominal apresentaram lesões hepáticas, confirmando que há lesão hepática indireta no processo e validando o modelo animal utilizado. Os grupos tratados com reperfusão fracionada apresentaram redução estatisticamente significativa na vacuolização hepática quando comparados aos outros grupos, o que demonstra um potencial protetor dessa abordagem. O pré-tratamento com alopurinol não reduziu nenhum dos parâmetros analisados.

Agradecimentos

Agradeço a professora Katia Sabrina Paludo, a Fundação Araucária e a UEPG.

Referências

CHEN, H.; WANG, L.; XING, B.Z.; LIU, X.H.; CHEN, Z.Y.; WENG, X.D.; et al. Ischemic postconditioning attenuates inflammation in rats following renal ischemia and reperfusion injury. **Exp Ther Med**. 2:513-518, 2015.

COGHLAN, J.G.; FLITTER, W.D.; CLUTTON, S.M.; PANDA, R.; DALY, R.; WRIGHT, G.; ILSLEY, C.D.; SLATER, T.F. Allopurinol pretreatment im- proves postoperative recovery and reduces lipid peroxidation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. J. Thorac. Car- diovasc. Surg., 107 (1), 248-256, 1994.

DIDONÉ, E.C.; CERSKI, C.T.; KALIL, A.N. N-acetilcisteína diminui a congestão hepática na lesão de isquemia e reperfusão - estudo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia.** 29: 191-196, 2002.

MESSIHA, B. A.; ABO-YOUSSEF, A. M. Protective effects of fish oil, allopurinol, and verapamil on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats, **J Nat Sci Biol Med**. 2015 Jul-Dec;6(2):351-5.

MIRANDA, L. E. C.; VIARO, F.; CENEVIVA, R.; EVORA, P. R. B. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 19: 3 -12, 2004.

PINHEIRO, B. V.; HOLANDA, M. A.; ARAUJO, F. G.; ROMALDINI, H. Lesão Pulmonar de Reperfusão. **Jornal de Pneumologia.** Brasília. 25:124-136, 1999.

ZHAO, Z.Q.; CORVERA, J.S.; HAKOS, M.E., KERENDI, F. WANG, N.P; GUYTON, R.A. Inhibition of myocardial injury by ischemic postcondicioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 285:579-588, 2003.