EMÍLIA CRISTINA PERES

**Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à
isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e
papel protetor da sinvastatina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2012**

EMÍLIA CRISTINA PERES

**Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à
isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e
papel protetor da sinvastatina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Venturini Rossoni

Versão original

**São Paulo
2012**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Peres, Emília Cristina.

Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à
isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e
papel protetor da sinvastatina / Emília Cristina Peres. --
São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia
e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha
de pesquisa: Fisiologia vascular.

Versão do título para o inglês: Study of vascular reactivity
in rats subjected to intestinal ischemia and reperfusion:
mechanisms involved and the protective role of simvastatin.

1. Endotélio vascular 2. Isquemia 3. Artéria pulmonar
I. Rossoni, Profa. Dra. Luciana Venturini II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0125/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Emília Cristina Peres.

Título da Dissertação: Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e papel protetor da sinvastatina.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **018** nas fls. **83** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luciana Venturini Rossoni, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito das estatinas nas alterações de função vascular em ratos submetidos á isquemia e reperfusão mesentérica** do qual participou(aram) o(s) **Emilia Cristina Peres**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **12.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de abril de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais, pelos maiores presentes: amor e base sólida, que
permitiram e permitirão trilhar meus caminhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os pequenos passos por mim dados e em todas as grandes conquistas por mim alcançadas.

Aos meus pais pelo amor, carinho, dedicação, educação, além de serem exemplo de força e coragem, que terei para vida.

A Professora Doutora Luciana Venturini Rossoni, pela orientação, confiança, amizade e acolhimento em seu laboratório.

A minha irmã pela cumplicidade e estar presente nos momentos difíceis para conclusão do meu mestrado.

As minhas amigas, Gisele e Camilla, por serem iluminadas, e sempre iluminarem minha vida. Não sei o que seria de mim sem vocês!

Ao Claudiomar pelo companheirismo, força, e principalmente por me amar incondicionalmente.

Aos meus tios Valdemar (*in memoriam*) e Yara pelo apoio e orientação a mim concedidos em todos os momentos de minha vida.

Aos meus primos, Marcos, Léo e Raquel, pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de laboratório por sempre me fazerem rir, por compartilharem comigo dos momentos duros de trabalho, pelas boas conversas regadas a café e por terem tornado meus momentos no laboratório muito agradáveis.

A Universidade de São Paulo pelas oportunidades ao longo da minha vida.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Departamento de Enfermagem do Hospital Universitário da USP pelo apoio para realização do curso de Mestrado.

Aos Professores da banca de qualificação pela contribuição com sua experiência e boas ideias.

Aos Professores da banca de defesa por lerem este trabalho.

A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para execução deste trabalho.

Muito obrigada!

Que tristes os caminhos, se não fora a
presença distante das estrelas!

Mário Quintana

RESUMO

Peres EC. Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e papel protetor da sinvastatina. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

A isquemia é a deficiência no fluxo de sangue para uma determinada área durante um período de tempo, incompatível com as necessidades metabólicas. Várias são as complicações presentes na isquemia e reperfusão intestinal (iIR), dentre elas destaca-se a lesão pulmonar. Sabe-se, que as estatinas são fármacos que apresentam resultados favoráveis nas lesões intestinais ocasionadas pela iIR. Entretanto, é desconhecido se os prejuízos ocasionados pela iIR estão relacionados a modificações na reatividade vascular e se os efeitos benéficos das estatinas na iIR estão correlacionados à esses ajustes vasculares. Objetivou-se neste estudo caracterizar a reatividade vascular no leito mesentérico e pulmonar e verificar se a sinvastatina é capaz de prevenir essas possíveis alterações. Ratos Wistar, ~2,5 meses, foram anestesiados e submetidos à oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) por 45 min e reperfusão por 2 h (IR). No grupo controle foi realizado o mesmo protocolo; porém, sem a oclusão da AMS (SHAM). Anéis de AMS e artéria pulmonar (AP) foram dissecados e montados em um sistema de órgãos isolados para medida da tensão isométrica. Curvas concentração-resposta (CCR) à acetilcolina (10^{-10} – 3×10^{-5} M), ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-10} – 3×10^{-5} M) e a fenilefrina (10^{-10} – 3×10^{-5} M) foram realizadas em anéis com (E+) e sem (E-) endotélio. Alguns anéis E+ de AP foram pré-incubados com o inibidor da sintase de óxido nítrico (NOS), L-NAME (100 μ M) ou com inibidor da NOS induzível (iNOS), 1400W (1 μ M), antes das CCR à acetilcolina e a fenilefrina. Em um sub-grupo: IR e SHAM foi realizado o pré-tratamento com sinvastatina (20mg/kg, *p.o.*) ou com veículo 1 h antes da iIR. Em seguida foram avaliadas as respostas: dependente e independente do endotélio e a contrátil em anéis de AP. A iIR não alterou a vasodilatação ao NPS em ambas as artérias. Nos anéis de AMS a iIR não alterou nem a vasodilatação à acetilcolina e nem a contração à fenilefrina. Entretanto, tanto as respostas à acetilcolina como à fenilefrina foram reduzidas em AP dos IR quando comparado ao SHAM. A pré-incubação com L-NAME como a E-, em ambos os grupos, reduziu a vasodilatação à acetilcolina e aumentou a contração à fenilefrina. Por sua vez, o 1400W melhorou a vasodilatação à acetilcolina e a hiporreatividade à fenilefrina observada nos anéis de AP dos IR, sem alterar a reatividade dos SHAM. Tanto a retirada do endotélio como a pré-incubação dos anéis de AP com L-NAME ou com 1400W aboliram as diferenças observadas entre os grupos estudados. O pré-tratamento com sinvastatina preveniu o prejuízo no relaxamento à acetilcolina assim como a hiporreatividade à fenilefrina nos anéis de AP dos IR, sem modificar a reatividade vascular dos SHAM. Concluindo-se que a iIR modificou a reatividade vascular na AP, porém sem alterar a mesma na AMS. Na AP a iIR causou disfunção endotelial, por meio de uma ativação da iNOS, a qual, levou a diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e hiporreatividade contrátil. Uma única dose de sinvastatina pré-iIR previne essas alterações, demonstrando o efeito benéfico desse fármaco provavelmente via uma ação anti-inflamatória e/ ou anti-oxidante.

Palavras-chave: Reatividade vascular. Isquemia e reperfusão intestinal. Endotélio. Sinvastatina. Artéria Pulmonar.

ABSTRACT

Peres EC. Study of vascular reactivity in rats subjected to intestinal ischemia and reperfusion: mechanisms involved and the protective role of simvastatin. [dissertation (Masters thesis in Human Physiology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

Ischemia is a deficiency in blood flow for a given area during a period of time, incompatible with the metabolic requirements. Several complications are present in intestinal ischemia and reperfusion (iIR), lung damage being one of the most important. It is known that statins are drugs that have favorable results in the intestinal lesions caused by iIR. However, it is unknown whether the damages caused by iIR are related to changes in vascular reactivity and the beneficial effects of statins on iIR are correlated to these vascular adjustments. The objective of this study was to characterize the vascular reactivity in mesenteric and pulmonary bed and verify whether simvastatin is able to prevent these possible changes. Wistar rats, ~2.5 months old, were anesthetized and subjected to occlusion of the superior mesenteric artery (SMA) for 45 min and reperfusion (IR) for 2 hours. The same protocol was performed in the control group, but without SMA occlusion (SHAM). SMA and pulmonary artery (PA) rings were dissected and mounted in an isolated organ system to measure the isometric tension. Concentration-response curves (CRC) to acetylcholine (10^{-10} – 3×10^{-5} M), to sodium nitroprusside (SNP, 10^{-10} – 3×10^{-5} M) and to phenylephrine (10^{-10} – 3×10^{-5} M) were performed in rings with (E+) and without (E-) endothelium. Some E+ rings of PA were preincubated with the inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), L-NAME (100 μ M) or with inhibitor of inducible NOS (iNOS), 1400W (1 μ M) prior to the CRC to acetylcholine and phenylephrine. In a subgroup: IR and SHAM pre-treatment with simvastatin (20mg/kg, *p.o.*) or with vehicle 1 hour before the iIR was performed. After that in PA rings the endothelium-dependent and -independent, and contractile responses were evaluated. The iIR did not alter vasodilatation to SNP in either artery. In SMA rings, iIR did not change the vasodilatation to acetylcholine or the contraction to phenylephrine. However, both responses to acetylcholine and to phenylephrine were reduced in PA of IR when compared with SHAM. The pre-incubation with L-NAME and the E-, in both groups, decreased the vasodilatation to acetylcholine and increased constriction to phenylephrine. In turn, the 1400W improved vasodilatation to acetylcholine and hyporeactivity to phenylephrine observed in rings of PA of IR, without changing the reactivity of SHAM. Both the removal of endothelium and the preincubation of PA rings with L-NAME or with 1400W abolished the differences observed between the groups. Pre-treatment with simvastatin prevented loss in the relaxation to acetylcholine and the hyporeactivity to phenylephrine in the rings of PA of IR, without modifying the vascular reactivity of SHAM. In conclusion, the iIR modified vascular reactivity in the PA; however, it did not change it in the SMA. In the PA, iIR caused endothelial dysfunction through an activation of iNOS, which resulted in a decrease of endothelium-dependent vasodilator response and contractile hyporeactivity. A single dose of simvastatin pre-iIR prevents these changes, demonstrating the beneficial effect of this drug probably via an anti-inflammatory and/ or anti-oxidant action.

Keywords: Vascular reactivity. Intestinal ischemia and reperfusion. Endothelium. Simvastatin. Pulmonary Artery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Curva concentração-resposta à acetilcolina	36
Figura 2 - Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis com endotélio preservado (E+) e sem endotélio (E-)	37
Figura 3 - Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio	39
Figura 4 - Curva concentração-resposta à fenilefrina	41
Figura 5 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis com endotélio preservado (E+) e sem endotélio (E-)	42
Figura 6 - Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de artéria pulmonar pré-incubados com L-NAME ou com 1400W	45
Figura 7 - Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis de artéria pulmonar de ratos SHAM e IR pré-incubados com L-NAME ou com 1400W	48
Figura 8 - Efeito da sinvastatina sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina	53
Figura 9 - Efeito da sinvastatina sobre a curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio	54
Figura 10 - Efeito da sinvastatina sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores da contração máxima ao cloreto de potássio (KCl) nos anéis de artéria mesentérica superior (Mesentérica) e nos anéis de artéria pulmonar (Pulmonar) na presença de endotélio preservado dos animais SHAM e IR	34
Tabela 2- Valores da porcentagem de pré contração à fenilefrina em relação à contração ao cloreto de potássio antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) ou ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos anéis de artéria mesentérica superior (Mesentérica) e de artéria pulmonar (Pulmonar) com endotélio preservado dos animais SHAM e IR	35
Tabela 3- Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-reposta à acetilcolina nos anéis de artéria mesentérica superior (Mesentérica) e de artéria pulmonar (Pulmonar) com endotélio preservado (E+) e sem (E-) endotélio dos animais SHAM e IR	38
Tabela 4- Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) nos anéis de artérias mesentérica superior e de artéria pulmonar com (E+) e sem (E-) endotélio dos animais SHAM e IR	43
Tabela 5- Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) nos anéis de artéria pulmonar com endotélio (E+), incubados com L-NAME (LN, 100 μM) ou com 1400W (1400W, 1 μM) dos animais SHAM e IR	46
Tabela 6- Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) nos anéis de artéria pulmonar com (E+), incubados com L-NAME (LN, 100 μM) ou incubados com 1400W (1400W, 1 μM) dos animais SHAM e IR	49
Tabela 7- Valores da contração máxima ao cloreto de potássio (KCl, 75mM) nos anéis de artéria pulmonar dos animais SHAM e IR, controle (CT) e nos grupos SHAM e IR, tratados com sinvastatina (SINV)	52
Tabela 8- Valores da porcentagem de contração à fenilefrina em relação à contração ao cloreto de potássio antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) ou ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos anéis de artéria pulmonar com endotélio dos animais SHAM e IR, controle (CT) e nos grupos SHAM e IR, tratados com sinvastatina (SINV)	52
Tabela 9- Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-reposta à acetilcolina (ACh), ao nitroprussiato de sódio (NPS) e à fenilefrina (FE) em anéis de artéria pulmonar dos animais SHAM, SHAM tratado com 20mg/kg de sinvastatina (SHAM SINV), IR e IR tratado com 20mg/kg de sinvastatina (IR SINV)	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

XO-	Xantina Oxidase
XD-	Xantina Desidrogenase
SOD-	Superóxido Dismutase
MODS-	Síndrome de disfunção múltipla de órgãos
iIR-	Isquemia e reperfusão intestinal
TN-	Fator de Necrose Tumoral
IL-	Interleucina
NO-	Óxido nítrico
cNOS-	Óxido nítrico sintase constitutiva
iNOS-	Óxido nítrico sintase induzível
eNOS-	Óxido nítrico sintase endotelial
LPS-	Lipopolissacarídeo
nNOS-	Óxido nítrico sintase neuronal
Gcs-	Guanilato ciclase solúvel
GMPC-	Guanosina monofosfato cíclico
Ca ⁺² -	Cálcio
K ⁺ -	Potássio
L-NAME-	Ng-Nitroarginina Metil Éster
HMG-CoA-	3-hidroxi-3 metilglutaril-coenzima A
PaO ₂ -	Pressão parcial de oxigênio no sangue
ALT-	Alanina aminotransferase
AST-	Asparagina aminotransferase
EDRFs-	Fatores relaxantes derivado do endotélio
EDCFs-	Fatores contráteis do endotélio
COX-	Ciclooxigenase

PKA- Proteína quinase A

KCl- Cloreto de potássio

1400W- N-(3-Aminomethyl)benzylacetamidine

ANOVA- Análise de variância

NPS- Nitroprussiato de sódio

ACh- Acetilcolina

FE- Fenilefrina

SDRA- Síndrome do desconforto respiratório agudo

ONOO⁻ - Peróxido nitrito

O₂⁻ - ânion superóxido

OH⁻ - radical de hidroxila

LOOH- hidroperóxido

TBARS- Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Animais experimentais	27
3.2 Obtenção dos modelos experimentais	27
3.2.1 Tratamento com sinvastatina	27
3.3 Estudo de reatividade vascular da artéria mesentérica e pulmonar	28
3.4 Protocolos experimentais	29
3.4.1 Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)	29
3.4.2 Avaliação do relaxamento	29
3.4.2.1 Avaliação do relaxamento dependente do endotélio	29
3.4.2.2 Avaliação do relaxamento independente do endotélio	29
3.4.3 Avaliação da resposta contrátil	30
3.4.4 Efeito da retirada do endotélio sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina e sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	30
3.4.5 Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina e sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	30
3.5 Protocolos experimentais após o tratamento com sinvastatina	31
3.6 Expressão dos dados e análises estatísticas	32
3.7 Drogas e diluições	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)	34
4.2 Respostas vasodilatadora dependente e independente do endotélio	35
4.3 Avaliação da resposta contrátil	40
4.4 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina	44
4.5 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	47
4.6 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a reatividade vascular	50
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	70
REFERENCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

A isquemia é a deficiência no fluxo de sangue para uma determinada área durante um período, que ocasiona a interrupção do suprimento de oxigênio e de nutrientes, acarretando em disfunção celular, morte celular e, finalmente, disfunção de tecido e órgão (Scannel et al., 1995). A isquemia é considerada uma emergência vascular, com taxas de mortalidade que podem chegar a 70% dos casos (Virgini-Magalhães; Mayall, 2009; Vollmar; Menger, 2011).

Nos Estados Unidos, a isquemia intestinal, ou a ausência ou diminuição do fluxo sanguíneo arterial ou venoso nos tecidos intestinais (Debus et al., 2011; Renner et al., 2011; Ribeiro; Yoshida, 2005), incide em uma de 1.000 admissões hospitalares (Brandt; Boley, 2000). No Brasil, o sistema DATASUS não discrimina a isquemia intestinal de distúrbios circulatórios em outras partes do organismo. Entretanto, é possível que a incidência da isquemia intestinal no Brasil seja mais elevada do que aquela documentada nos Estados Unidos.

Sua etiologia pode ser oclusiva, como embolia e trombose; ou não-oclusiva, como baixo fluxo sanguíneo e vasoespasmo induzido por drogas vasoativas (Debus et al., 2011; Renner et al., 2010; Ribeiro; Yoshida, 2005). Na embolia arterial, as principais causas da isquemia oclusiva são trombos murais da cavidade cardíaca associados a infarto do miocárdio e fibrilação atrial (Debus et al., 2011; Renner et al., 2010; Ribeiro; Yoshida, 2005). A trombose arterial instala-se em placa aterosclerótica, que pode ser de origem degenerativa ou inflamatória (Ribeiro; Yoshida, 2005). Na isquemia não-oclusiva, a diminuição do fluxo sanguíneo intestinal ocorre em diferentes situações clínicas, como trauma, choque de qualquer etiologia, queimaduras, pós-operatório de cirurgias cardíaca e torácica, assim como no transplante de intestino delgado (Debus et al., 2011; Kannan et al., 2011; Renner et al., 2010; Ribeiro; Yoshida, 2005;).

O procedimento para correção da isquemia ou de suas consequências depende da extensão da isquemia e da causa da obstrução. De maneira geral, procura-se restabelecer fluxo ao intestino ainda viável, geralmente com revascularização da artéria mesentérica e ressecção das porções necróticas (Baptista-Silva; Souza-Moraes, 2006). Entretanto, sabe-se que o tempo entre a confirmação diagnóstica e a introdução de métodos terapêuticos para restabelecer o fluxo sanguíneo é importante para reduzir as taxas de mortalidade (Debus et al., 2011). Nas isquemias não oclusivas, a causa deve ser identificada e removida o mais brevemente possível (Renner et al., 2010). Porém sabe-se que a restauração do suprimento sanguíneo, ou

reperfusão, pode ter efeitos deletérios que se somam aos da isquemia, com consequências danosas para o tecido (Ribeiro; Yoshida, 2005; Scannel et al., 1995).

Na isquemia, ocorre acúmulo de hipoxantina e xantina oxidase (XO) (Grace, 1994). Isso porque durante a fase isquêmica, a diminuição do aporte de oxigênio leva ao acúmulo de cálcio no citosol, que, por sua vez, promove a quebra de uma ponte peptídica da xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima XO (Ribeiro; Yoshida, 2005). A XO, diferentemente da XD, necessita de oxigênio para realizar a conversão da hipoxantina em xantina (Grace, 1994). Com a reintrodução de oxigênio por meio da reperfusão, a hipoxantina é oxidada a xantina e esta, metabolizada a ácido úrico, gerando como subproduto o ânion superóxido. Este transforma-se em peróxido de hidrogênio espontaneamente ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), e o peróxido de hidrogênio, por sua vez, é transformado em água pela ação da catalase e da glutathione peroxidase (Ribeiro; Yoshida, 2005). Como a hipoxantina ficou acumulada durante a isquemia, a produção de radicais livres na reperfusão acaba sobrepujando a capacidade de neutralização pelos antioxidantes endógenos, de modo que os radicais livres passam a exercer livremente as suas ações deletérias (Grace, 1994; Horton; Walker, 1993). Desse modo, a reperfusão agrava as alterações celulares ocasionadas pela isquemia, já que os radicais livres acumulados lesam as membranas celulares, atraindo neutrófilos e estimulando a liberação de mediadores inflamatórios (Ribeiro; Yoshida, 2005; Scannel et al., 1995).

Além das alterações e lesões locais, acredita-se que, na vigência da reperfusão, produtos tóxicos possam ter acesso à circulação e promovam importantes alterações no estado funcional do organismo (Deitch et al., 2001; Paterno; Longo, 2008; Ribeiro; Yoshida, 2005) mesmo em sítios distantes de onde foi desencadeada a isquemia. Há relatos de que a Síndrome de Disfunção Múltipla de Órgãos (MODS) ocorra em decorrência de alterações no sistema gastrointestinal ocasionadas por processos de isquemia e reperfusão (Carrico et al., 1986; Clark e Coopersmith, 2007; Deitch et al., 2001; Hassoun et al, 2001; Magnotti; Deitch, 2005).

A MODS é caracterizada pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos (Mongardon et al., 2009). É a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes criticamente doentes, com taxas de mortalidade superiores a 40% (Deitch, 2010). No contexto do trauma, é a principal causa de morte em pessoas com idade inferior a 40 anos e uma das principais causas de morte em pacientes vítimas de trauma (Deitch, 2010).

Considerando-se a gravidade das consequências da isquemia intestinal e de seu tratamento, a compreensão dos mecanismos pelos quais o choque hemorrágico no trauma e condições pró-inflamatórias, como queimaduras e pancreatite, levam à síndrome da angústia respiratória aguda (não-infecciosa) e MODS é de grande relevância para o tratamento clínico (Deitch, 2010). Vários estudos buscam elucidar qual o papel do intestino na origem e na propagação de doenças críticas, como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e a MODS (Carrico et al., 1986; Clark; Coopersmith, 2007; Deitch, 2010; Deitch et al., 2001; Hassoun et al., 2001; Magnotti; Deitch, 2005). Em 1986, Carrico e colaboradores consideraram a hipótese de que a deficiência da função de barreira do intestino permitia a translocação de bactérias intestinais para a circulação portal e sistêmica, o que acarretaria a propagação da MODS em situações em que as defesas do hospedeiro se apresentavam comprometidas (Carrico et al., 1986).

Outros trabalhos demonstram que a hipoperfusão intestinal induzida pelo choque, seguida da reperfusão intestinal, origina mediadores inflamatórios que podem causar a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e, assim, contribuir para a instalação da MODS (Hassoun et al, 2001; Moore et al., 1994). Experimentalmente, evidenciou-se que um período de isquemia seguido por um período de reperfusão intestinal causa inflamação pulmonar, ativação intestinal da fosfolipase A₂ e recrutamento intestinal de neutrófilos, o que confirma que o intestino é gerador de mediadores inflamatórios que modulam a injúria pulmonar aguda (Moore et al., 1994).

Em acordo com esses achados, diversos estudos sugerem que a disfunção pulmonar, a inflamação sistêmica e a MODS causadas pelo trauma gastrointestinal decorrem dos efeitos dos mediadores inflamatórios provindos do intestino e drenados a partir do sistema linfático mesentérico (Deitch, 2001; Deitch, 2010; Magnotti et al., 1998; Magnotti et al., 2005). Um importante fundamento para essa hipótese é o conceito de que o leito vascular pulmonar seja o primeiro leito exposto à linfa mesentérica, uma vez que esta atinge a circulação sistêmica por meio do ducto torácico e desemboca na veia subclávia, atingindo o pulmão (Magnotti et al., 2005). Assim, sugere-se que a ligação do ducto linfático mesentérico previna a apoptose pulmonar, o sequestro de neutrófilos e o aumento da permeabilidade pulmonar provocados pela isquemia e pela reperfusão intestinal (iIR) em situações de queimaduras e choque hemorrágico (Deitch, 2001; Deitch, 2010; Magnotti et al., 1998; Magnotti et al., 2005).

Adicionalmente, Cavriani e colaboradores (2005) também demonstraram que o sistema linfático mesentérico exerce função primordial nas disfunções intestinal e pulmonar

ocasionadas pela iIR (Cavriani et al., 2005). Esse estudo revela que as lesões causadas pela iIR, tanto no pulmão quanto no intestino, são parcialmente dependentes do fator de necrose tumoral (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória gerada no tecido intestinal lesado pela iIR e transportada pelo sistema linfático (Cavriani et al., 2005). Além do TNF- α , sabe-se que o ducto linfático é uma importante via de transporte para outras citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-10, ambas geradas pelo tecido intestinal durante a iIR (Cavriani et al., 2005; Deitch, 2001), que poderiam contribuir para a inflamação sistêmica e a MODS. Sugere-se que a IL-1 β gerada durante a reperfusão pode estar envolvida na hiporreatividade do músculo liso bronquial ocasionada pela iIR (Coelho et al., 2007). Além disso, esse estudo demonstra que a IL-1 β gerada na reperfusão alcança o pulmão através da linfa, estimulando a geração de óxido nítrico (NO) que desencadeia a hiporreatividade bronquial em animais submetidos a iIR quando comparados aos animais falso-operados (Coelho et al., 2007).

O NO desempenha um papel crucial na regulação homeostática dos sistemas cardiovascular, neuronal e imune (Moncada et al., 1991a e b). Nos vasos, o NO protege contra trombose e aterosclerose, induz relaxamento dos vasos sanguíneos, previne agregação plaquetária, inibe a proliferação de células do músculo liso vascular e diminui a expressão de genes pró-inflamatórios (Forstermann et al., 1993; Forstermann; Munzel, 2006). Nas células endoteliais, sensores e receptores de membrana respondem a estímulos fisiológicos com aumento da concentração intracelular de cálcio e/ ou fosforilação dos sítios alvo para a ativação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). A posterior formação do complexo cálcio-calmodulina ativa a NOS, responsável pela clivagem do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO (Fleming, 2010), aumentando portanto a síntese de NO. A NOS é dividida em dois grandes grupos de isoformas: a constitutiva (cNOS), dependente da elevação dos níveis intracelulares de cálcio, e a induzível (iNOS), independente das elevações de cálcio, mas dependente da ativação de citocinas ou estímulos patológicos como LPS (Lipopolissacarídeo) (Forstermann; Sessa, 2012). A cNOS apresenta a isoforma endotelial (eNOS) e a isoforma neuronal (nNOS) (Davel et al., 2011; Forstermann, 2010; Forstermann; Sessa, 2012).

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (GCs) estimulando sua atividade catalítica, o que leva à formação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, por sua vez, diminui os níveis intracelulares de cálcio pela recaptação para o retículo sarcoplasmático e pela extrusão de cálcio para o meio extracelular por meio das Ca⁺²-ATPases (Bian et al., 2008; Napoli; Ignarro, 2009). Há diminuição dos níveis de cálcio

também por meio da abertura de canais para K^+ e da ativação da Na^+ , K^+ -ATPase, com consequente hiperpolarização de membrana e posterior fechamento dos canais para cálcio dependentes de voltagem (Bian et al., 2008; Napoli; Ignarro, 2009). Além do mais, há redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, devido a ativação da proteína quinase G (PKG) (Bian et al., 2008; Napoli; Ignarro, 2009).

Vários estudos identificam o NO como um potencial mediador na iIR que liga as alterações locais às alterações sistêmicas (Cavriani et al., 2004; Coelho et al., 2007; Ward et al., 2000; Yasmin et al., 1997). O tratamento de ratos com inibidores da NOS minutos antes da iIR aponta evidências da modulação nitrérgica. Demonstrou-se que a administração do L-NAME, inibidor não seletivo da NOS, causa aumento da magnitude das alterações induzidas por iIR, como aumento do TNF- α plasmático, sequestro de neutrófilos no pulmão e aumento da permeabilidade microvascular pulmonar, podendo causar a morte dos animais. Por outro lado, o inibidor seletivo da iNOS inibiu o aumento da permeabilidade microvascular pulmonar, o que sugere que tanto a isoforma constitutiva quanto a induzível da NOS modulam as alterações inflamatórias encontradas na iIR (Cavriani et al., 2004). Assim, a modulação exercida pelas isoformas da NOS ocorre diferentemente, de acordo com a isoforma.

Ward e colaboradores (2000) propuseram que durante o período de reperfusão intestinal há declínio da atividade da cNOS, como resultado, observa-se o surgimento das manifestações clínicas da iIR, como lesão da mucosa e aumento da permeabilidade capilar. Propõe-se que no início da isquemia ocorra a combinação de NO derivado do endotélio com o ânion superóxido (proveniente de neutrófilos ativados), formando peroxinitrito, poderoso oxidante (Ward et al., 2000; Yasmin et al., 1997) e que, durante a reperfusão, ocorra queda da produção de NO proveniente da cNOS, o que acarreta na resposta inflamatória sistêmica (Ward et al., 2000). Portanto, a perda do balanço entre as atividades das sintases de NO (cNOS e iNOS) pode ser sugerida como uma das causas dos prejuízos ocasionados pela iIR (Yasmin et al., 1997; Ward et al., 2000; Cavriani et al., 2004).

Senthil e colaboradores (2007) demonstraram que a linfa retirada de animais submetidos a trauma e choque hemorrágico e administrada intravenosamente em ratos controles é capaz de gerar lesão pulmonar. Essa lesão está associada ao aumento plasmático das concentrações de nitrato/nitrito, bem como ao aumento da expressão proteica da iNOS em pulmão, fígado e intestino. Concluiu-se que a linfa de animais submetidos a trauma e choque

hemorrágico é suficiente para induzir lesão pulmonar aguda, por intermédio de uma via dependente de iNOS.

Adicionalmente, foi demonstrado que a iIR induz alterações no funcionamento de diferentes leitos vasculares e que tais alterações vasculares podem estar relacionadas a mudanças na modulação nitrérgica (Chen et al., 2006; Koksoy et al., 2000; Savoye et al., 2005).

Koksoy e colaboradores (2000) demonstraram que existe uma menor participação do óxido nítrico sobre a pressão de perfusão média no leito vascular pulmonar de ratos submetidos à iIR, quando comparados aos falso-operados, o que indica menor modulação nitrérgica basal nas artérias pulmonares após a iIR (Koksoy et al., 2000).

Em artéria mesentérica superior, Chen e colaboradores (2006) sugeriram que a iIR reduz a resposta máxima à fenilefrina (agonista seletivo α_1 -adrenérgico) em ratos, e que a queda na reatividade vascular estava associada ao aumento da expressão gênica e proteica da eNOS e da iNOS no intestino delgado. Adicionalmente, Savoye e colaboradores (2005), em estudos com artéria mesentérica de ratos, demonstraram que a ativação da iNOS parece estar envolvida na hiporreatividade ocasionada pelo choque hemorrágico seguido de reposição volêmica. Os autores afirmam que a hiporreatividade é prevenida pelo uso de mercatopropionil, um sequestrador não-seletivo de radicais livres, defendendo a hipótese de que NO produzido por meio da ativação da iNOS pode interagir com ânion superóxido para formar peroxinitrito, com alto poder oxidativo (Savoye et al., 2005).

Como ressaltado anteriormente, a iIR é conhecida por ser uma doença que causa prejuízo no funcionamento normal do intestino e também por causar lesões em órgãos distantes, especialmente o pulmão, um dos primeiros órgãos atingidos. Reconhece-se o efeito do sistema linfático mesentérico na propagação de mediadores inflamatórios gerados na iIR, bem como no surgimento de resposta inflamatória sistêmica. Pelos dados encontrados na literatura, conclui-se que o NO parece estar envolvido na propagação da resposta sistêmica e nas lesões causadas no intestino e no pulmão. As alterações vasculares na iIR parecem ser dependentes do leito vascular estudado e da metodologia empregada para o estudo; entretanto, devido ao número reduzido de trabalhos e a falta de padronização quanto ao tempo de isquemia e reperfusão, não é possível afirmar o quanto os ajustes vasculares podem contribuir para a gravidade da iIR.

Por outro lado, têm-se buscado possíveis tratamentos que diminuam as implicações locais e sistêmicas associadas às altas taxas de mortalidade na iIR e alguns estudos buscam definir os efeitos das estatinas na isquemia e na reperfusão de órgãos.

As estatinas são inibidores seletivos e competitivos da 3-hidroxi-3 metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, e são largamente usadas no tratamento e no controle da hipercolesterolemia, das dislipidemias e da doença arterial coronariana (Maron et al., 2000). Além disso, propriedades pleiotrópicas das estatinas, como a anti-inflamatória e a antioxidante, estão sendo reveladas. Há relatos de que as estatinas são capazes de melhorar a função endotelial, aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico, apresentar ações imunomodulatórias, estabilizar placas ateroscleróticas, participar no remodelamento vascular, reduzir a apoptose e modular a função plaquetária, entre outros efeitos (Alvarez De Sotomayor et al., 2000; Briones et al., 2009; Gelosa et al., 2007).

As ações pleiotrópicas das estatinas têm sido exploradas também em pacientes expostos à reperfusão cardíaca por procedimentos percutâneos ou cirúrgicos (Biccard et al., 2005; Paraskevas et al., 2007; Paraskevas et al., 2008). A terapia com estatina no pré-operatório de cirurgia de revascularização do miocárdio melhora a perfusão miocárdica da área enxertada no pós-operatório, bem como reduz a liberação de citocinas (IL-6 e IL-8) e a adesão de neutrófilos no endotélio venoso, sendo o NO o possível mediador para esses mecanismos (Paraskevas et al., 2007). Além disso, o tratamento pré-operatório com estatina também parece estar associado com menores taxas de mortalidade pós-cirurgia cardíaca (Paraskevas et al., 2007). Com esses dados, pode-se inferir que as estatinas podem ser benéficas para amenizar os prejuízos causados pela isquemia e pela reperfusão de diferentes órgãos.

Além dos estudos com humanos, em modelos animais de isquemia e reperfusão de órgãos, as estatinas também apresentam resultados favoráveis. Em coração de ratos Wistar, o tratamento com 15 mg/kg/dia de lovastatina, por 12 dias, diminuiu a área de infarto por oclusão da artéria coronária esquerda (Kocsis et al., 2008). Assim como o tratamento crônico, o tratamento agudo com estatinas também é capaz de reduzir a área de infarto, como verificado pela redução do tecido necrótico em ratos submetidos à administração de uma dose intravenosa de sinvastatina (1 mg/kg) uma hora antes da oclusão da artéria coronária descendente anterior (25 minutos de isquemia seguida de 2 horas de reperfusão) (Wayman et al., 2003). Adicionalmente, o pré-tratamento com 5 mg/kg de sinvastatina, intravenoso, em coelhos submetidos a 30 minutos de oclusão da artéria coronária esquerda seguidos de 48

horas de reperfusão diminuiu a área infartada, efeito correlacionado à produção aumentada de NO (Bao et al., 2009), que foi apontado como o provável mediador dos efeitos da sinvastatina. Além do mais, Lefer e colaboradores (1999) demonstraram que a melhora do fluxo coronariano associado a administração de 25 µg de sinvastatina intraperitoneal, 18 horas antes do processo de isquemia e reperfusão miocárdica em ratos, parece estar relacionada a um aumento da produção de NO.

Corroborando os dados acima citados, outros estudos apontam que a reperfusão com sinvastatina melhora a função cardíaca em coração isolado submetido ao processo de isquemia e reperfusão (Szárszoi et al., 2008; Zheng et al., 2006). A função ventricular esquerda em animais submetidos a oclusão da artéria coronária descendente anterior foi melhorada pelo tratamento por quatro semanas com sinvastatina (40 mg/kg/por dia/por gavagem), efeito este relacionado a uma queda dos níveis de citocinas inflamatórias e a um aumento dos níveis citocinas anti-inflamatórias nos miócitos cardíacos (Zhang et al., 2005). Também foi observada redução na deposição de colágeno na área remanescente ao infarto e, portanto, sugeriu-se que a redução da deposição de colágeno e a melhora a função ventricular se devem à modulação da função inflamatória ocasionada pelo tratamento com sinvastatina (Zhang et al., 2005). Adicionalmente, foi sugerido que os efeitos benéficos das estatinas no infarto agudo do miocárdio são independentes da redução dos níveis plasmáticos de colesterol (Lefer et al., 1999; Wayman et al., 2003; Zhang et al., 2005).

Em outros órgãos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão, as estatinas também têm se mostrado eficazes na redução das injúrias. Em pulmão de ratos, o tratamento com 0,5 mg/kg de sinvastatina, administrado por via oral por 5 dias antes do experimento, preveniu o aumento da permeabilidade vascular pulmonar e o sequestro de neutrófilos causados pelo processo de isquemia e reperfusão, tanto no tecido pulmonar quanto no lavado broncoalveolar (Naidu et al., 2003). Além disso, verificou-se que os efeitos benéficos da sinvastatina sobre a permeabilidade vascular foram inibidos com o uso de L-NAME e que a redução da expressão proteica da eNOS nos pulmões foi prevenida pelo tratamento com sinvastatina (Naidu et al., 2003). Exemplificando, ainda, os efeitos benéficos da sinvastatina na iIR, demonstrou-se que o pré-tratamento com sinvastatina (10 mg/kg/dia) durante 3 dias, com administração da última dose uma hora antes da iIR, reduziu a gravidade da lesão aguda pulmonar induzida pela iIR em ratos; tendo sido registradas melhoras na pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO₂) e na saturação de oxigênio e diminuição da infiltração de neutrófilos no pulmão (Pirat et al., 2006).

No fígado de ratos, o processo de isquemia e reperfusão aumentou os níveis da alanina e da asparagina aminotransferase (ALT, AST, respectivamente), indicadores de dano hepático (Dibazar et al., 2008; Lai et al., 2008). Entretanto, tanto o tratamento por via oral com 10mg/kg/dia de sinvastatina, administrada durante 3 dias antes da isquemia e da reperfusão hepática, como o pré-tratamento com administração intraperitoneal de 5 mg/kg de sinvastatina, 24 horas antes da isquemia e reperfusão hepática, preveniram o dano hepático (Dibazar et al., 2008; Lai et al., 2008).

Em rins de ratos, o pré-tratamento com uma única dose de sinvastatina (1 mg/kg/*i.v.*) melhorou a disfunção renal causada por 45 minutos de isquemia e 4 horas de reperfusão, reduzindo a fração de excreção de sódio e os níveis plasmáticos de ureia e creatinina, aumentados em decorrência da isquemia e reperfusão (Todorovic et al., 2008).

Similarmente ao que ocorre em pulmão, fígado e rim, no intestino de ratos foi demonstrado que o pré-tratamento com sinvastatina (10 mg/kg/dia), administrada oralmente durante quatro dias antes da iIR, foi eficaz em reduzir os danos. Esse efeito foi associado à diminuição do nível sérico do TNF- α e do nível tecidual de malondialdeído, produto final da peroxidação de lipídios utilizado na avaliação do estresse oxidativo, e à elevação dos níveis de glutathione peroxidase e superóxido dismutase intestinal, enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante (Hajipour et al., 2009). Agudamente, as estatinas também demonstram ser benéficas na iIR intestinal: o tratamento com sinvastatina imediatamente antes da isquemia e após 24 horas previne a destruição da mucosa intestinal e diminui o índice de apoptose no jejuno e íleo (Slijper et al., 2010). Adicionalmente, em ratos submetidos a isquemia e reperfusão da artéria mesentérica, o tratamento agudo com rovastatina (10 mg/kg), uma hora antes da isquemia, bloqueia a geração de mediadores inflamatórios, como TNF- α e citocina induzida por neutrófilo quimioatraente-1 (CINC-1), e preserva a expressão proteica da eNOS, suprimindo, assim, a inflamação intestinal (Naito et al., 2006).

Recentemente, numerosos estudos têm demonstrado que as estatinas parecem estar envolvidas também no restabelecimento ou na melhoria da função endotelial nas doenças cardiovasculares (Briones et al., 2009; Gelosa et al., 2007; Omori et al., 2002; Tawfik et al., 2006). Um estudo demonstrou que uma única dose de pravastatina (40 mg/dia) foi capaz de melhorar a função coronariana em pacientes portadores de disfunção arterial coronariana, sem que houvesse redução significativa nos níveis de colesterol (Wassmann et al., 2003).

A disfunção endotelial, presente em diversas doenças cardiovasculares, é uma condição patológica caracterizada pelo desbalanço entre a liberação de fatores relaxantes

derivados do endotélio (EDRFs) — o óxido nítrico, a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio — e de fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) – endotelina, as prostaglandinas, a angiotensina II e as espécies reativas do oxigênio (Davel et al., 2011). Em humanos, Omori e colaboradores (2002) demonstraram que a administração de cerivastatina, em uma única dose, é capaz de aumentar a responsividade endotelial em humanos saudáveis, sugerindo um efeito direto nos vasos independentemente de diminuir os lipídios. Adicionalmente, em culturas de células endoteliais, a incubação com cerivastatina por 24 horas aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico (Berkels et al., 2003).

Em ratos portadores de diabetes induzida por estreptozotocina, a disfunção endotelial presente no leito mesentérico foi atenuada após a exposição aguda com lovastatina (10 μ M, por 20 minutos). Esse efeito foi mediado pelo óxido nítrico, uma vez que foi bloqueado pela administração de inibidor não-seletivo da sintase de óxido nítrico (Fatehi-Hassanabad et al., 2006). Além disso, a administração aguda de estatinas ao banho de órgãos produziu relaxamento vascular em artérias de condutância e de resistência provenientes de ratos Wistar e SHR, tanto por sua ação no músculo liso vascular como no endotélio (Alvarez De Sotomayor et al., 2000; Bravo et al., 1998; Perez-Guerrero et al., 2000). Os estudos demonstraram que o relaxamento dependente do endotélio induzido pela sinvastatina envolve um aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico por mecanismo sensível a superóxido dismutase e relacionado à síntese de produtos vasodilatadores derivados da ciclooxigenase (COX) (Alvarez De Sotomayor et al., 2000).

Ainda no que se refere aos efeitos da sinvastatina, Rossoni e colaboradores (2011) demonstraram que sua administração aguda (1 μ M, durante 2 horas) em artérias mesentéricas de resistência de ratos diminui a vasoconstrição induzida por U46619, análogo do tromboxano A₂. A sinvastatina, nessa condição, aumentou a síntese de NO, via aumento da fosforilação da eNOS por meio da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Além da ativação da AMPK, outros estudos demonstram que o tratamento agudo com estatina em células endoteliais é também capaz de ativar a fosforilação da eNOS por meio de proteína quinase A (PKA) e Akt (Harris et al., 2004; Sun et al., 2006).

Portanto, considerando a literatura, pode-se dizer que as estatinas agem no sistema vascular, melhorando a disfunção endotelial nas doenças cardiovasculares, além de terem ações benéficas em modelos de isquemia e reperfusão de órgãos. Entretanto, pouco se sabe sobre as alterações vasculares na iIR, e não se conhece em que extensão os benefícios das estatinas na iIR são devidos a ajustes vasculares.

Assim, visto que as alterações vasculares podem contribuir para a gravidade da iIR, condição com altas taxas de mortalidade, o presente estudo buscou elucidar as alterações vasculares presentes nessa patologia e avaliar os efeitos da administração aguda de sinvastatina nas alterações vasculares presentes na iIR e, dessa forma esclarecer se os benefícios da sinvastatina, descritos na iIR, são devidos a melhoras nos ajustes vasculares. Portanto, a hipótese deste estudo é de que existam alterações vasculares na iIR e que estas possam ser revertidas pela administração aguda de sinvastatina, de forma a melhorar o prognóstico da doença.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a escassez de informações sobre o papel da reatividade vascular nas alterações locais desencadeadas pela isquemia e reperfusão intestinal (iIR), bem como dos mecanismos pelos quais a iIR induz modificações patológicas sérias em órgãos distantes do sítio da isquemia, especialmente o pulmão, este estudo teve por objetivo caracterizar a reatividade vascular nos leitos mesentérico e pulmonar após a iIR. Adicionalmente, tendo sido considerados os efeitos benéficos da sinvastatina em doenças cardiovasculares, este estudo buscou avaliar o efeito da sinvastatina sobre os ajustes da reatividade vascular após a iIR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (280-340 g), com aproximadamente dois meses e meio de idade, provenientes do biotério de criação Dra Lor Cury do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas sob condições controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e alimentação no biotério de experimentação animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/USP, até que atingissem a idade necessária para realização dos experimentos.

Os presentes protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Protocolo registrado sob nº 018 fls. 83 do livro 02).

3.2 Obtenção dos modelos experimentais

Em um primeiro momento, para caracterização da reatividade vascular na isquemia, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: animais submetidos ao procedimento isquemia e reperfusão intestinal (IR) e animais falso operado (SHAM).

Para obtenção dos modelos experimentais os animais foram anestesiados com uma mistura contendo ketamina, xilazina e acetopromazina (64,9; 3,20 e 0,78 mg/kg, respectivamente, *i.p.*). Após a confirmação do plano anestésico, o abdômen foi submetido a uma laparotomia na linha Alba e a artéria mesentérica superior foi exposta e ocluída com o auxílio de um clampe para microcirurgia. Depois de 45 minutos de oclusão (período de isquemia), o clampe foi removido, a parede abdominal foi suturada e a perfusão intestinal foi restabelecida por um período de 2 horas (período de reperfusão), conforme utilizado por Cavriani e colaboradores (2004).

Cabe ressaltar que os animais SHAM foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, exceto pela oclusão da artéria mesentérica superior.

3.2.1 Tratamento com sinvastatina

Em um sub-grupo de animais foi realizado gavagem, 1 hora antes da indução anestésica para realização do procedimento cirúrgico de isquemia e reperfusão intestinal.

A sinvastatina foi administrada na dose de 20 mg/kg, via oral. A escolha dessa dose, foi realizada baseada no trabalho de Zhang e colaboradores (2010), que analisam a farmacocinética da sinvastatina (20 mg/kg, *v.o.*), em ratos, e observaram que a concentração plasmática máxima da sinvastatina é atingida com aproximadamente 48 minutos pós-administração.

O tratamento com sinvastatina foi realizado em um grupo de ratos aleatoriamente escolhidos. Os animais foram separados em quatro grupos: os que eram submetidos ao procedimento de isquemia e reperfusão (conforme descrito acima) e recebiam carboxetilcelulose (IR/ CT); os que eram submetidos à IR e recebiam sinvastatina (IR/ SINV); os que foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, exceto pela oclusão da artéria mesentérica superior e recebiam carboxetilcelulose (SHAM/ CT); e um SHAM que recebia a sinvastatina (SHAM/ SINV).

3.3 Estudo de reatividade vascular da artéria mesentérica e pulmonar

Após as duas horas de reperfusão, os ratos foram novamente anestesiados, como descrito acima, mortos e exsanguinados. A artéria mesentérica superior e o pulmão foram cuidadosamente removidos e imersos em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição (em mM): NaCl 118,4; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,5; glicose 11; MgSO₄ H₂O 1,2; KH₂PO₄ 2H₂O 1,2 e EDTA 0,01); gaseificado com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), mantendo pH estável de 7,4. Em seguida, as artérias mesentérica superior e pulmonar foram dissecadas e limpas de tecido conectivo.

Para os experimentos de reatividade vascular, as artérias foram divididas em segmentos de 2-3 mm de comprimento denominados anéis vasculares. Em alguns anéis, a camada endotelial foi removida mecanicamente através do uso de fios metálicos.

Para obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi montado em um sistema para órgãos isolados. As cubas continham 5 mL de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37 °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios metálicos foram passados através do lúmen das artérias. Um fio metálico foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (Letica TRI 210, Barcelona, Espanha). A tensão isométrica foi registrada por meio de um transdutor de força, o qual estava conectado a um pré-amplificador e a um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems, Santa Barbara, California) e esse, a um

computador. Os anéis foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g e essa tensão é reajustada a cada 15 minutos, durante os 45 minutos de estabilização.

3.4 Protocolos experimentais

3.4.1 Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)

Após 45 minutos de estabilização, foi administrado KCl (75 mM) para comprovar a viabilidade funcional de todas as artérias estudadas. Assim, os anéis que contraíram menos que 0,5 g, foram descartados. Após 30 minutos de estabilização, novamente foi administrado KCl (75 mM) e foram aguardados aproximadamente 30 minutos até que fosse atingido a estabilização da resposta contrátil. A resposta máxima induzida pelo KCl foi considerada 100% da resposta contrátil do anel vascular.

3.4.2 Avaliação do relaxamento

3.4.2.1 Avaliação do relaxamento dependente do endotélio

Depois da avaliação da resposta contrátil ao KCl 75 mM, os anéis foram lavados com solução de Krebs-Heinseleit e, em seguida, uma estabilização de 30 minutos foi aguardada. Após essa, os anéis de artéria pulmonar e mesentérica foram pré-contraídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 40-60 % da resposta máxima de contração ao KCl 75 mM). Após a obtenção de um platô de contração à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta, cumulativas ao agonista muscarínico acetilcolina (10^{-10} – 3×10^{-5} M), para avaliar o relaxamento dependente do endotélio.

3.4.2.2 Avaliação do relaxamento independente do endotélio

Em alguns anéis, escolhidos aleatoriamente foi realizado teste da viabilidade endotelial. Para realização desse teste, os anéis de artéria pulmonar e mesentérica foram pré-contraídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 40-60 % da resposta máxima de contração ao KCl 75mM). Após a obtenção de um platô de contração à fenilefrina, a resposta vasodilatadora à acetilcolina (10^{-5} M) foi avaliada para confirmação da presença de

endotélio. Se confirmada a presença do endotélio a partir de uma resposta vasodilatadora à acetilcolina superior a 60%, os anéis eram novamente lavados com solução de Krebs-Heinseleit e, em seguida, uma estabilização de 30 minutos era aguardada. Em seguida, os anéis de artéria pulmonar e mesentérica foram, novamente, pré-contraídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 40-60 % da resposta máxima de contração ao KCl 75 mM). Após a obtenção de um platô de contração curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (10^{-10} - 3×10^{-5} M), doador de óxido nítrico, foi realizada para avaliar o relaxamento independente do endotélio.

3.4.3 Avaliação da resposta contrátil

Após 30 minutos da confirmação da viabilidade funcional do endotélio (conforme descrito acima, item 3.4.2.2), alguns anéis de artéria pulmonar e mesentérica com endotélio íntegro, foram separados para a realização de curvas concentração-resposta ao agonista seletivo α_1 -adrenérgico fenilefrina (10^{-10} - 3×10^{-5} M), de maneira cumulativa.

3.4.4 Efeito da retirada do endotélio sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina e sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Com a finalidade de avaliar a habilidade do endotélio em modular a resposta vasodilatadora à acetilcolina e constritora à fenilefrina, em alguns experimentos o endotélio foi removido mecanicamente por meio do uso de fios metálicos. A ausência do endotélio foi confirmada a partir de uma resposta vasodilatadora à acetilcolina (10^{-5} M) inferior a 20 % da resposta à fenilefrina, a partir dessa confirmação, foi construída as curvas concentração resposta cumulativas à acetilcolina (10^{-10} - 3×10^{-5} M) ou à fenilefrina (10^{-10} - 3×10^{-5} M), tanto em anéis de artéria pulmonar, quanto em anéis de artéria mesentérica.

3.4.5 Efeito do bloqueio da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina e sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Diante dos resultados obtidos com as curvas concentração-resposta à acetilcolina e à fenilefrina, com e sem endotélio, optou-se por realizar os protocolos seguintes somente nos anéis de artéria pulmonar.

Assim, para avaliar a função do óxido nítrico na modulação da resposta vasodilatadora à acetilcolina (10^{-10} – 3×10^{-5} M) e constritora à fenilefrina (10^{-10} – 3×10^{-5} M), curva concentração-resposta a estes agonistas foram realizadas em anéis pré-incubados durante 30 minutos com Ng-Nitroarginina Metil Éster (L-NAME 100 μ M), inibidor não seletivo da NOS.

Para avaliar a função do óxido nítrico sintetizado pela sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) na modulação da resposta vasodilatadora à acetilcolina (10^{-10} – 3×10^{-5} M) e constritora à fenilefrina (10^{-10} – 3×10^{-5} M), curva concentração-resposta a estes agonistas foram realizadas em anéis pré-incubados durante 40 minutos com N-(3-Aminomethyl)benzylacetamidine (1400W, 1 μ M) (Chiao et al., 2008).

3.5 Protocolos experimentais após o tratamento com sinvastatina

Assim, a avaliação dos efeitos da sinvastatina foi realizada através da avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio, KCl (75 mM), o qual foi administrado 45 minutos após estabilização para comprovar a viabilidade funcional de todos os anéis de artéria pulmonar. Dessa forma, os anéis que contraíram menos que 0,5 g, foram descartados. Após 30 minutos de estabilização, novamente foi administrado KCl (75 mM) e foram aguardados aproximadamente 30 minutos até que fosse atingido a estabilização da resposta contrátil. A resposta máxima induzida pelo KCl foi considerada 100% da resposta contrátil do anel vascular.

Depois da avaliação da resposta contrátil ao KCl 75 mM, os anéis foram lavados com solução de Krebs-Heinseleit e, em seguida, uma estabilização de 30 minutos foi aguardada. Após essa, os anéis de artéria pulmonar foram pré-contraídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 40-60 % da resposta máxima de contração ao KCl 75 mM). Após a obtenção de um platô de contração à fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-resposta, cumulativas ao agonista muscarínico acetilcolina (10^{-10} – 3×10^{-5} M), para avaliar o relaxamento dependente do endotélio.

Em alguns anéis, escolhidos aleatoriamente foi realizado teste da viabilidade endotelial. Para realização desse teste, os anéis de artéria pulmonar foram pré-contraídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 40-60 % da resposta máxima de contração ao KCl 75 mM). Após a obtenção de um platô de contração à fenilefrina, a resposta vasodilatadora à acetilcolina (10^{-5} M) foi avaliada para confirmação da presença de endotélio. Se confirmada a presença do endotélio a partir de uma resposta vasodilatadora à acetilcolina

superior a 60%, os anéis eram novamente lavados com solução de Krebs-Heinseleit e, em seguida, uma estabilização de 30 minutos era aguardada. Em seguida, os anéis de artéria pulmonar foram, novamente, pré-contráídos com uma concentração submáxima de fenilefrina (aproximadamente 40-60 % da resposta máxima de contração ao KCl 75 mM). Após a obtenção de um platô de contração curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (10^{-10} - 3×10^{-5} M), doador de óxido nítrico, foi realizada para avaliar o relaxamento independente do endotélio.

A resposta contrátil foi avaliada em alguns anéis, escolhidos aleatoriamente, após 30 minutos da confirmação da viabilidade funcional do endotélio (conforme descrito acima), anéis de artéria pulmonar com endotélio íntegro, foram separados para a realização de curvas concentração-resposta ao agonista seletivo α_1 -adrenérgico fenilefrina (10^{-10} - 3×10^{-5} M), de maneira cumulativa.

3.6 Expressão dos dados e análises estatísticas

Para cada curva concentração-resposta foram calculados os valores de pD_2 ($-\log. EC_{50}$) e resposta máxima (R_{max}) utilizando o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A).

A análise estatística dos resultados foi realizada por Teste-t ou análise de variância (ANOVA), uma via ou duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizadas, de acordo com o desenho experimental de cada protocolo. Quando a ANOVA apresentou significância estatística, o teste post-hoc de Bonferroni foi aplicado (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.7 Drogas e diluições

Todos os sais utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit foram comprados da Synth (Brasil). O 1400W (100050) foi comprado na Calbiochem (Alemanha). As demais drogas utilizadas no presente estudo: cloridrato de acetilcolina (A-6625), nitroprussiato de sódio (S 0501), fenilefrina (P 6126), L-NAME (N5751) e EDTA (E 1004.01.AF), foram compradas da Sigma-Aldrich (EUA). Todas as drogas foram diluídas em água destilada. As soluções-estoque foram mantidas a $-20^\circ C$ e as diluições a serem utilizadas foram preparadas antes de cada lote de experimentos.

Para o tratamento com sinvastatina, a medicação foi comprada na forma comercial, do laboratório Sandoz. A medicação foi macerada e suspensa em carboximetilcelulose.

4 RESULTADOS

Na primeira parte da sessão resultados (itens de 4.1 a 4.3) serão descritas as características encontradas na reatividade vascular dos anéis de artéria mesentérica superior e pulmonar, após a isquemia e reperfusão intestinal.

4.1 Avaliação da resposta vasoconstritora ao cloreto de potássio (KCl)

A resposta contrátil induzida pelo cloreto de potássio (75mM) não diferiu entre os grupos SHAM e IR nem nos anéis de artéria mesentérica superior nem de artéria pulmonar (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores da contração máxima ao cloreto de potássio (KCl) nos anéis de artéria mesentérica superior (Mesentérica) e nos anéis de artéria pulmonar (Pulmonar) na presença de endotélio preservado dos animais SHAM e IR.

	Mesentérica		Pulmonar	
	SHAM	IR	SHAM	IR
KCl	1,47 ± 0,15 g (12)	1,42 ± 0,12 g (14)	0,70 ± 0,02 g (31)	0,70 ± 0,03 g (36)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± EPM. Análise estatística utilizada Teste-t.

4.2 Respostas vasodilatadora dependente e independente do endotélio

Os valores do platô de pré-contracção à fenilefrina antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio nos anéis de artéria mesentérica superior e artéria pulmonar com endotélio preservado, provenientes de animais dos grupos SHAM e IR, estão representados na Tabela 2.

Tanto nos anéis de artéria mesentérica superior quanto nos de artéria pulmonar dos animais SHAM e IR não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, na pré-contracção à fenilefrina antes da curva-concentração resposta à acetilcolina ou ao nitroprussiato de sódio, (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores da porcentagem de pré-contracção à fenilefrina em relação à contracção ao cloreto de potássio antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) ou ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos anéis de artéria mesentérica superior (Mesentérica) e de artéria pulmonar (Pulmonar) com endotélio preservado dos animais SHAM e IR.

	Mesentérica		Pulmonar	
	Pré-contracção		Pré-contracção	
	NPS	ACh	NPS	ACh
SHAM	55,1 ± 3,32% (07)	40,4 ± 4,70 % (05)	50,9 ± 7,69% (05)	52,8 ± 3,10 % (13)
IR	47,7 ± 4,44% (08)	55,0 ± 7,77 % (06)	54,3 ± 9,12% (07)	52,0 ± 3,32 % (18)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1-via.

Na figura 1 está representada as curvas-concentração resposta à acetilcolina nos anéis de artéria mesentérica superior e artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM e IR. Em ambas as artérias estudadas, de ambos os grupos a acetilcolina induziu relaxamento na dependência da concentração utilizada (Figura 1A e B).

Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas concentração-resposta à acetilcolina realizadas nas artérias mesentérica superior dos grupos SHAM e IR (Figura 1A). Já as artérias pulmonares do grupo IR apresentaram uma redução na resposta vasodilatadora induzida pela à acetilcolina quando comparada ao grupo SHAM (Figura 1B e Tabela 3).

Figura 1 - Curva concentração-resposta à acetilcolina

Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis com endotélio preservado de artéria mesentérica superior (A) e de artéria pulmonar (B) de ratos submetidos a iIR e falso operados (SHAM). O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média±EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias: * $P < 0,05$ IR vs. SHAM.

A remoção mecânica do endotélio nos anéis de artérias mesentérica superior e pulmonar, de ambos os grupos estudados, reduziu a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina (Figura 2A e B). Além disso, a remoção do endotélio nos anéis de artéria pulmonar aboliu a diferença na resposta máxima à acetilcolina observada entre os grupos SHAM e IR (Figura 2B e Tabela 3).

Figura 2 - Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis com endotélio preservado (E+) e sem endotélio (E-) de artéria mesentérica superior (A) e de artéria pulmonar (B).

Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis com endotélio preservado (E+) e sem endotélio (E-) de artéria mesentérica superior (A) e de artéria pulmonar (B) de ratos submetidos a iIR e falso operados (SHAM). O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média±EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias: * $P < 0,05$ IR vs. SHAM, # $P < 0,05$ E- vs. E+.

Tabela 3 - Valores de sensibilidade (pD₂) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-reposta à acetilcolina nos anéis de artéria mesentérica superior (Mesentérica) e de artéria pulmonar (Pulmonar) com endotélio preservado (E+) e sem (E-) endotélio dos animais SHAM e IR.

		SHAM		IR	
		pD ₂	R _{max}	pD ₂	R _{max}
Mesentérica	E+	7,41 ± 0,10	98,0 ± 2,2 % (05)	7,26 ± 0,15	91,1 ± 3,6 % (06)
	E-	-	15,9 ± 3,0 % (05) [#]	-	13,8 ± 3,1 % (05) [#]
Pulmonar	E+	7,11 ± 0,12	88,1 ± 1,4 % (13)	6,94 ± 0,11	77,7 ± 2,4 % (18)*
	E-	-	9,1 ± 4,9 % (04) [#]	-	2,2 ± 6,7 % (04) [#]

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1- via: * P<0,05 IR vs. SHAM; [#] P<0,05 E- vs. E+.

Similar ao observado no relaxamento à acetilcolina, o nitroprussiato de sódio (NPS) promoveu um relaxamento de modo dependente da concentração utilizada, tanto nos anéis de artéria mesentérica superior, quanto nos anéis de artéria pulmonar de ambos os grupos estudados (Figura 3A e 3B). Em ambas as artérias estudadas, não foram observadas diferenças significativas no relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio entre os grupos SHAM e IR (Artéria pulmonar: SHAM: R_{max} : $95,7 \pm 2,26$, pD_2 : $7,92 \pm 0,16$; IR: R_{max} : $95,8 \pm 4,7$, pD_2 : $8,00 \pm 0,21$ / Artéria mesentérica: SHAM: R_{max} : $100,4 \pm 0,8$, pD_2 : $7,93 \pm 0,09$; IR: R_{max} : $103,8 \pm 2,4$, pD_2 : $8,21 \pm 0,07$) (Figura 3).

Figura 3 - Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio

Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artéria mesentérica superior (**A**) e de artéria pulmonar (**B**) de ratos submetidos a iIR e falso operados (SHAM). O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média±EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias.

4.3 Avaliação da resposta contrátil

Na figura 4 está representado a curva-concentração resposta à fenilefrina nos anéis de artéria mesentérica superior e nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM e IR. A fenilefrina aumentou o tônus na dependência da concentração utilizada tanto na artéria mesentérica superior quanto na artéria pulmonar de ratos SHAM e com IR da artéria mesentérica (Figura 4A e B).

Nos anéis de artéria mesentérica superior não foram observadas diferenças significativas na resposta de contração mediada pela fenilefrina entre os grupos SHAM e IR (Figura 4A e Tabela 4). Porém, nos anéis de artéria pulmonar provenientes de animais IR a resposta contrátil à fenilefrina foi de menor magnitude quando comparada aos anéis de artéria pulmonar dos animais SHAM (Figura 4B e Tabela 4).

Em ambos os grupos, remoção do endotélio tanto dos anéis de artéria mesentérica superior como os de artéria pulmonar deslocou a curva concentração resposta à fenilefrina para a esquerda (Figura 5). Esse deslocamento da curva concentração resposta à fenilefrina nos anéis de artéria mesentérica superior proveniente dos animais SHAM e IR foi de magnitude similar, não induzindo alterações significativas entre os grupos (Figura 5A e Tabela 4). Por sua vez, a remoção do endotélio aboliu a redução da resposta contrátil à fenilefrina observada nos anéis de artéria pulmonar dos animais submetidos a iIR quando comparado aos SHAM (Figura 5B e Tabela 5). Assim, a remoção do endotélio nos anéis de artéria pulmonar bloqueou a diferença que existia entre os grupos.

Figura 4 - Curva concentração-resposta à fenilefrina

Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis com endotélio de artéria mesentérica superior (**A**) e de anéis de artéria pulmonar (**B**) de ratos submetidos a iIR e falso operados (SHAM). Os resultados representam a % de contração em resposta ao KCl. O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias: * P<0,05 IR vs.SHAM.

Figura 5 - Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis com endotélio preservado (E+) e sem endotélio (E-)

Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis com endotélio preservado (E+) e sem endotélio (E-) de artéria mesentérica (A) e de artéria pulmonar (B) de ratos submetidos a iIR e falso operados (SHAM). Os resultados representam a % de contração em resposta ao KCl. O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias: * $P < 0,05$ IR vs. SHAM; # $P < 0,05$ E- vs. E+.

Tabela 4 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) nos anéis de artérias mesentérica superior e de artéria pulmonar com (E+) e sem (E-) endotélio dos animais SHAM e IR.

		SHAM		IR	
		pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
Mesentérica	E+	$5,92 \pm 0,25$	$105,6 \pm 5,7 \% (05)$	$5,65 \pm 0,39$	$104,2 \pm 4,4 \% (05)$
	E-	$6,52 \pm 0,18$	$146,9 \pm 7,4 \% (05)^{\#}$	$6,40 \pm 0,14$	$150,8 \pm 10,8 \% (04)^{\#}$
Pulmonar	E+	$7,44 \pm 0,07$	$73,9 \pm 3,4 \% (21)$	$7,22 \pm 0,05$	$55,8 \pm 3,3 \% (22)^*$
	E-	$7,72 \pm 0,13$	$103,0 \pm 3,0 \% (07)^{\#}$	$7,74 \pm 0,06^{\#}$	$105,7 \pm 9,7 \% (06)^{\#}$

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1-via: * $P < 0,05$ IR vs. SHAM; $^{\#}$ $P < 0,05$ E- vs. E+.

4.4 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina

Como já referido anteriormente, a partir deste momento focou-se o estudo somente na artéria pulmonar, pois os resultados observados nas artérias pulmonares foram mais expressivos que os observados nos anéis de artéria mesentérica superior. Além disso, é conhecido que o pulmão é o principal órgão de choque na iIR (Cavriani 2004; Koksoy et al., 2001; Kuzu et al., 2002; Mitsuoka et al., 1999).

Para avaliar o papel do óxido nítrico sobre a resposta de relaxamento em artérias pulmonares dos ratos SHAM e IR, os anéis de artérias com endotélio preservado foram previamente incubados com L-NAME (100 μ M). Nas figuras 6A e B estão representadas as curvas concentração-resposta à acetilcolina, na presença de L-NAME, nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM e IR; respectivamente. Nos anéis de artéria pulmonar de ambos os grupos experimentais, a incubação com L-NAME inibiu o relaxamento mediado pela acetilcolina, além de abolir a diferença observada entre os grupos estudados (Figura 6A e B e Tabela 5).

Para avaliar a modulação da iNOS sobre a resposta à acetilcolina, os anéis de artéria pulmonar com endotélio preservado foram incubados com 1400W (1 μ M) durante 40 minutos. Nas figuras 6C e D estão representadas as curvas concentração-resposta à acetilcolina, na presença de 1400W, nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM e IR, respectivamente. A incubação com 1400W não alterou a resposta vasodilatadora à acetilcolina nos anéis de artéria pulmonar do grupo SHAM (Figura 6 C e Tabela 5). Porém, nos anéis de artéria pulmonar do grupo IR a incubação com 1400W aumentou a resposta máxima à acetilcolina sem modificar a pD₂ a esse agonista (Figura 6D e Tabela 5). É importante ressaltar que na presença de 1400W, não se observou diferença na resposta vasodilatadora dependente do endotélio entre os anéis de artéria pulmonar provenientes dos animais SHAM e IR (Tabela 5).

Figura 6 - Curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de artéria pulmonar pré-incubados com L-NAME ou com 1400W

Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de artéria pulmonar de ratos submetidos a iIR (IR, à direita) e falsos operados (SHAM, à esquerda). Curva realizada em anéis de artéria pulmonar com endotélio preservado (E+), pré-incubados com inibidor da sintase de óxido nítrico L-NAME (LN, 100 μ M) (A e B) ou com inibidor da sintase de óxido nítrico induzível (1400W, 1 μ M) (C e D). O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias: # $P < 0,05$ LN vs. E+.

Tabela 5 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) nos anéis de artéria pulmonar com endotélio (E+), incubados com L-NAME (LN, 100 μ M) ou com 1400W (1400W, 1 μ M) dos animais SHAM e IR.

	SHAM		IR	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
E+	$7,11 \pm 0,12$	$88,1 \pm 1,4 \%$ (13)	$6,94 \pm 0,11$	$77,7 \pm 2,4 \%$ (18)*
LN	-	$1,9 \pm 2,2 \%$ (09) [#]	-	$3,7 \pm 3,2 \%$ (09) [#]
1400W	$7,26 \pm 0,08$	$82,0 \pm 2,30 \%$ (05)	$7,13 \pm 0,11$	$89,8 \pm 2,07 \%$ (06) [#]

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1-via: * $P < 0,05$ IR vs. SHAM; [#] $P < 0,05$ LN ou 1400W vs. E+

4.5 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para avaliar o papel do óxido nítrico sobre a resposta de contrátil induzida pela fenilefrina em artérias pulmonares dos ratos SHAM e IR, os anéis de artérias com endotélio preservado foram previamente incubados com L-NAME (100 μ M). Nas figuras 7A e B estão representadas as curvas concentração-resposta à fenilefrina, na presença de L-NAME, nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM e IR, respectivamente. A incubação dos anéis de artéria pulmonar com L-NAME desviou a curva concentração-resposta à fenilefrina para a esquerda (Figura 7A e B). No grupo SHAM, a pré-incubação com L-NAME, aumentou somente a resposta máxima a fenilefrina, sem apresentar diferença significativa na pD₂ (Figura 7A e Tabela 6). Porém, no grupo IR a incubação com L-NAME aumentou tanto a pD₂ quanto a resposta máxima à fenilefrina (Figura 7B e Tabela 6). Além disso, como observado na resposta de relaxamento à acetilcolina, a incubação dos anéis de artéria pulmonar com L-NAME aboliu a diferença na resposta contrátil à fenilefrina entre os grupos SHAM e IR (Figura 7A e B e Tabela 6).

Para avaliar a modulação da iNOS sobre a resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de artéria pulmonar com endotélio intacto foram incubados com 1400W (1400W, 1 μ M) durante 40 minutos. Nas figuras 7C e D estão representadas as curvas concentração-resposta à fenilefrina, na presença de 1400W, nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM e IR, respectivamente. A incubação com 1400W não alterou a resposta contrátil à fenilefrina nos anéis de artéria pulmonar do grupo SHAM (Figura 7C e Tabela 6). Já nos anéis de artéria pulmonar do grupo IR, a incubação com 1400W desviou a curva concentração-resposta à fenilefrina para esquerda, aumentando somente a resposta máxima a esse agonista contrátil (Figura 7D e Tabela 6). É importante ressaltar que assim como na resposta à acetilcolina, na presença de 1400W não se observou diferença entre as artérias proveniente dos animais SHAM e IR (Figura 7C e D e Tabela 6).

Figura 7 - Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis de artéria pulmonar de ratos SHAM e IR pré-incubados com L-NAME ou com 1400W

Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis de artéria pulmonar de ratos submetidos a iIR (IR, à direita) e falsos operados (SHAM, à esquerda). Curva realizada em anéis de artéria pulmonar com endotélio (E+), pré-incubados com inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME (LN, 100 μ M) (A e B) ou com inibidor da síntese de óxido nítrico induzível (1400W, 1 μ M) (C e D). O n representa o número de animais utilizados. Resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2 vias: # $P < 0,05$ LN ou 1400W vs. E+.

Tabela 6 - Valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) nos anéis de artéria pulmonar com (E+), incubados com L-NAME (LN, 100 μ M) ou incubados com 1400W (1400W, 1 μ M) dos animais SHAM e IR.

	SHAM		IR	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
E+	$7,44 \pm 0,07$	$73,9 \pm 3,41 \%$ (21)	$7,22 \pm 0,05$	$55,8 \pm 3,29 \%$ (22)*
LN	$7,73 \pm 0,09$	$103,5 \pm 2,8 \%$ (11) [#]	$7,67 \pm 0,12^{\#}$	$109,5 \pm 3,89 \%$ (09) [#]
1400W	$7,46 \pm 0,07$	$76,0 \pm 3,35 \%$ (09)	$7,47 \pm 0,05$	$71,5 \pm 4,96 \%$ (09) [#]

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1-via: * $P < 0,05$ IR vs. SHAM; [#] $P < 0,05$ LN ou 1400W vs. E+.

4.6 Efeito do tratamento com sinvastatina sobre a reatividade vascular

Os valores da contração máxima ao cloreto de potássio (75mM) dos anéis de artéria pulmonar, provenientes de animais dos grupos SHAM/ CT, SHAM/ SINV, IR/ CT e IR/ SINV estão representados na tabela 7. Nos quatro grupos estudados não houve diferenças significativas na resposta contrátil máxima induzida pelo cloreto de potássio, ou seja o tratamento com sinvastatina não alterou a resposta contrátil induzida pelo cloreto de potássio (Tabela 7).

Os valores de platô da pré-contração à fenilefrina antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina ou ao nitroprussiato de sódio, nos anéis de artéria pulmonar, provenientes de animais dos grupos SHAM/ CT, SHAM/ SINV, IR/ CT e IR/ SINV estão representados na tabela 8. Assim como a resposta ao KCl 75mM, não foram observadas diferenças significativas nos quatro grupos estudados entre a pré-contração à fenilefrina antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina e nem ao nitroprussiato de sódio (Tabela).

Na figura 8 estão representados as curvas concentração-resposta à acetilcolina nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM/ CT, SHAM/ SINV, IR/ CT e IR/ SINV. Em todos os grupos avaliados, a acetilcolina induziu relaxamento na dependência da concentração utilizada. Como demonstrado anteriormente, a iIR reduziu o relaxamento à acetilcolina quando comparado ao grupo SHAM (Tabela 9). O tratamento com sinvastatina não alterou resposta à acetilcolina no grupo SHAM, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre as curvas concentração-resposta à acetilcolina realizadas na artéria pulmonar do grupo SHAM/ CT e SHAM/ SINV (Figura 8A e Tabela 9). Já nas artérias pulmonares do grupo IR a sinvastatina preveniu a redução na resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (Figura 8B e Tabela 9). Sendo que a artéria pulmonar do grupo IR/ SINV teve uma maior resposta máxima induzida pela à acetilcolina quando comparadas ao grupo IR/ CT e igual aos grupos SHAM/ CT e SHAM/ SINV (Tabela 9).

Na figura 9 estão representadas as curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM/ CT, SHAM/ SINV, IR/ CT e IR/ SINV. Similar ao observado no relaxamento à acetilcolina, o nitroprussiato de sódio (NPS) promoveu um relaxamento de modo dependente da concentração utilizada em todos os

grupos estudados (Figura 9A e B). Porém, não foram observadas diferenças significativas no relaxamento induzido pelo NPS entre os grupos avaliados (Figura 9A e B e Tabela 9).

Na figura 10 estão representadas as curvas concentração-resposta à fenilefrina nos anéis de artéria pulmonar dos animais dos grupos SHAM/ CT, SHAM/ SINV, IR/ CT e IR/ SINV. A fenilefrina aumentou o tônus arterial na dependência da concentração utilizada em todos os grupos estudados (Figura 10A e B). Como demonstrado anteriormente, a iIR reduziu a resposta de contração induzida pela fenilefrina nos anéis de artéria pulmonar quando comparada à cirurgia fictícia (SHAM) (Tabela 9). O tratamento com sinvastatina não alterou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina nos anéis de artéria pulmonar do grupo SHAM (Figura 10). Porém, o mesmo aumentou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina nos anéis de artéria pulmonar do grupo IR (Figura 10B e Tabela 9). Após o tratamento com sinvastatina não observa-se mais a redução da contração induzida pela fenilefrina entre os grupos SHAM/ SINV e IR/ SINV (Tabela 9).

Tabela 7 - Valores da contração máxima ao cloreto de potássio (KCl, 75mM) nos anéis de artéria pulmonar dos animais SHAM e IR, controle (CT) e nos grupos SHAM e IR, tratados com sinvastatina (SINV).

	SHAM		IR	
	CT	SINV	CT	SINV
KCl	0,76 ± 0,05 g (09)	0,65 ± 0,04 g (11)	0,63 ± 0,02 g (07)	0,70 ± 0,05 g (08)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1-via.

Tabela 8 - Valores da porcentagem de contração à fenilefrina em relação à contração ao cloreto de potássio antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) ou ao nitroprussiato de sódio (NPS) nos anéis de artéria pulmonar com endotélio dos animais SHAM e IR, controle (CT) e nos grupos SHAM e IR, tratados com sinvastatina (SINV).

	Pré-contração			
	ACh		NPS	
	CT	SINV	CT	SINV
SHAM	47,3 ± 3,09 % (07)	47,6 ± 4,02 % (07)	56,7 ± 3,17 % (05)	42,7 ± 4,51 % (05)
IR	46,3 ± 3,46 % (08)	44,5 ± 2,74 % (09)	41,6 ± 6,54 % (05)	44,3 ± 4,20 % (07)

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os valores estão expressos como média ± EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 1-via.

Figura 8 - Efeito da sinvastatina sobre a curva concentração-resposta à acetilcolina

Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de artéria pulmonar provenientes de animais SHAM tratados com veículo (SHAM/ CT) ou com sinvastatina (SHAM/ SINV) (A) e animais IR tratados com veículo (IR/ CT) ou com sinvastatina (IR/ SINV) (B). O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2-vias.

Figura 9 - Efeito da sinvastatina sobre a curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio

Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artéria pulmonar provenientes de animais SHAM tratados com veículo (SHAM/ CT) ou com sinvastatina (SHAM/ SINV) (A) e animais IR tratados com veículo (IR/ CT) ou com sinvastatina (IR/ SINV) (B). O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2-vias.

Figura 10 - Efeito da sinvastatina sobre a curva concentração-resposta à fenilefrina

Curva concentração-resposta à fenilefrina (FE) em anéis de artéria pulmonar provenientes de animais SHAM tratados com veículo (SHAM/ CT) ou com sinvastatina (SHAM/ SINV) (A) e animais IR tratados com veículo (IR/ CT) ou com sinvastatina (IR/ SINV) (B). O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Análise estatística utilizada ANOVA 2-vias: # $P < 0,05$ SINV vs. CT

Tabela 9- Valores de sensibilidade (pD₂) e resposta máxima (R_{max}) obtidos por meio de curvas concentração-reposta à acetilcolina (ACh), ao nitroprussiato de sódio (NPS) e à fenilefrina (FE) em anéis de artéria pulmonar dos animais SHAM, SHAM tratado com 20mg/kg de sinvastatina (SHAM SINV), IR e IR tratado com 20mg/kg de sinvastatina (IR SINV)

	ACh		NPS		FE	
	pD ₂	R _{max}	pD ₂	R _{max}	pD ₂	R _{max}
SHAM/ CT	7,14 ± 0,15	88,8 ± 1,19 % (07)	7,95 ± 0,26	89,0 ± 1,93 % (05)	7,20 ± 0,07	66,3 ± 3,95 % (09)
SHAM/ SINV	7,23 ± 0,12	85,3 ± 1,25 % (07)	7,70 ± 0,05	92,7 ± 1,14 % (05)	7,19 ± 0,07	62,1 ± 3,73 % (11)
IR/ CT	7,07 ± 0,21	78,5 ± 2,23 % (08)*	7,55 ± 0,15	91,1 ± 1,61 % (04)	7,16 ± 0,09	50,1 ± 2,95 % (07)*
IR/ SINV	7,05 ± 0,08	88,3 ± 1,21 % (09) [#]	7,70 ± 0,05	93,8 ± 1,34 % (07)	7,11 ± 0,07	62,9 ± 2,71 % (08) [#]

O número de animais analisados em cada grupo experimental está entre parênteses. Os resultados são expressos como média ± EPM. ANOVA 1-via: *P<0,05 IR/ CT vs. SHAM/ CT; [#] P<0,05 IR/ SINV vs. IR/ CT.

5 DISCUSSÃO

Apesar de continuamente e progressivamente a medicina apresentar melhora de recursos diagnósticos e tratamentos inovadores, a isquemia intestinal ainda é uma doença com alta taxa de mortalidade. Além disso, pode ter como consequência a SDRA e a MODS, sendo que a MODS é a principal causa de morte em pacientes críticos. Esses fatos justificam a importância da busca pela compreensão dos mecanismos que atuam na isquemia intestinal, bem como de sua terapêutica eficaz. Como detalhado na introdução, o sistema linfático é uma das vias por meio das quais a iIR promove alterações em órgãos-alvo, como o pulmão (Cavriani et al., 2005; Deitch, 2010; Deitch, 2001; Magnotti et al., 1998; Magnotti et al., 2005). Porém, o conhecimento das alterações do sistema vascular e de sua contribuição para o comprometimento de órgãos e desfechos indesejáveis da iIR permanece insuficiente.

No presente estudo, a primeira resposta obtida foi a constatação de que os ajustes de reatividade vascular observados na iIR ocorrem na dependência do leito vascular estudado. Surpreendentemente, na artéria mesentérica superior a iIR não alterou a reatividade vascular dependente e independente do endotélio nem a agentes vasodilatadores, nem ao agonista seletivo α_1 -adrenérgico, fenilefrina. Já na artéria pulmonar, a iIR causou disfunção endotelial e hiporreatividade à fenilefrina. O óxido nítrico produzido por meio da ativação da iNOS parece ter papel crucial nos ajustes na artéria pulmonar, os quais estão portanto associados com alterações na modulação nitrérgica. Adicionalmente, confirmando a hipótese da presente dissertação, o pré-tratamento agudo com sinvastatina foi capaz de prevenir as alterações de reatividade vascular provocadas pela iIR.

Sabe-se que o endotélio vascular constitui a monocamada celular interna dos vasos sanguíneos, sendo considerado um tecido ativo e dinâmico (Tang; Vanhoutte, 2010; Vanhoutte, 1996), responsável por controlar funções importantes no organismo, tais como a regulação do tônus vascular, manutenção da circulação sanguínea, coagulação sanguínea, permeabilidade vascular e a resposta inflamatória. Dessa forma, o endotélio representa uma interface entre os elementos da circulação e os vários sistemas do organismo (Gonzales; Selwyn, 2003). A resposta vasomotora modulada pelo endotélio ocorre tanto em função do estresse de cisalhamento induzido pelo fluxo sanguíneo que incide sobre a parede do vaso, como por meio da ligação de agonistas aos seus receptores específicos na membrana das células endoteliais (Gonzales; Selwyn,

2003; Moyna et al., 2004). A disfunção endotelial, presente em várias doenças cardiovasculares e inflamatórias, corresponde a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, a agregação plaquetária, a coagulação e a fibrinólise, sendo o tônus vascular o aspecto mais estudado (Mombouli; Vanhoute, 1999). A disfunção endotelial também é frequentemente referida como a piora no relaxamento dependente do endotélio e/ou uma anormalidade da resposta a agentes contráteis, causadas comumente pela redução da biodisponibilidade do NO, muito embora a produção de outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio também possam estar alteradas (Davel et al., 2011; Mombouli; Vanhoute, 1999).

Dentro desse contexto, a presente dissertação revelou que a iIR induziu disfunção endotelial na artéria pulmonar; porém, não modificou a vasodilatação dependente do endotélio na artéria mesentérica superior. Na artéria pulmonar de animais submetidos a iIR, houve redução da vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina e não se modificou a habilidade do músculo liso em relaxar em resposta a um doador de NO. É importante salientar que a remoção endotelial inibiu quase que por completo o relaxamento induzido pela acetilcolina tanto na artéria mesentérica superior quanto na artéria pulmonar. Porém, na artéria pulmonar, a remoção mecânica das células endoteliais aboliu o prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio ocasionada pela iIR. Conjuntamente, nossos dados demonstram que a iIR modifica a função das células endoteliais.

Similar ao que foi observado no presente estudo, Köksoy e colaboradores (2000) demonstraram a presença de disfunção endotelial no leito pulmonar de animais submetidos a iIR. Entretanto, outros trabalhos demonstram disfunção endotelial na artéria mesentérica após a iIR (Banda et al., 1997; Soydan et al., 2009), diferentemente do encontrado nos anéis de artéria mesentérica superior na presente dissertação. Porém, um desses trabalhos foi realizado com camundongo (Banda et al., 1997) e o outro foi realizado com tempo de isquemia e reperfusão diferente do realizado neste trabalho (Soydan et al., 2009).

Pelos presentes resultados, é possível inferir que apesar de a artéria mesentérica superior ser alvo do processo de iIR, a artéria pulmonar tem sua função vasodilatadora dependente do endotélio prejudicada pela iIR. Uma possível hipótese para o efeito mais atenuado da iIR na função endotelial da artéria mesentérica superior quando comparada à artéria pulmonar, pode ser relacionada ao fato de ser pronunciada a lesão pulmonar ocasionada pela iIR via ducto linfático (Cavriani et al., 2005; Deitch, 2010; Magnotti et

al., 1998; Magnotti et al., 2005). O sistema linfático é um importante componente do sistema imunológico, transportando células desse sistema provenientes do espaço intersticial para circulação sistêmica. Sabe-se que, durante a iIR, além de linfócitos serem ativados (Aprahamian et al., 2008, Edgerton et al., 2009), citocinas como TNF- α , IL-1 β , -6, -8 e -10, mediadores lipídicos e radicais livres estão incluídos na fisiopatologia das lesões teciduais ocasionadas por essa doença (Bhatia et al., 2004). Assim, parece razoável considerar que o sistema linfático tem função primordial na inflamação sistêmica e lesão pulmonar causadas pela iIR, como demonstrado por vários estudos que consideram o sistema linfático um modulador da lesão pulmonar aguda após trauma no intestino.

Recentemente, Breithaupt-Faloppa e colaboradores (2012) sugeriram que fatores linfáticos drenados do intestino durante iIR estimulam o pulmão a gerar mediadores inflamatórios e alteram a expressão de moléculas de adesão. Nesse trabalho, a iIR provocou aumento dos níveis de IL-1 β , IL-10 e IL-6 no tecido pulmonar de ratos, além de alterar a expressão proteica das moléculas de adesão, diminuindo a expressão de PECAM-1 e aumentando a E-selectin. A ligadura do ducto linfático inibiu tanto o aumento dos níveis de IL-1 β e IL-10 como as alterações da expressão proteica das moléculas de adesão presentes no pulmão após a iIR, o que confirma que a homeostasia pulmonar é alterada pela linfa drenada do intestino durante a iIR (Breithaupt-Faloppa et al., 2012). Assim, é plausível hipotetizar que o distúrbio na homeostasia pulmonar ocasionado pela linfa drenada do intestino durante a iIR poderia favorecer a disfunção endotelial presente na artéria pulmonar, como demonstrado neste trabalho.

O relaxamento independente do endotélio, tanto nos anéis de artéria mesentérica quanto nos anéis de artéria pulmonar, não foi alterado pela iIR. Em artérias pulmonares, resultado semelhante já havia sido demonstrado por Köksoy e colaboradores (2000). Entretanto, em outro modelo de isquemia e reperfusão diretamente no pulmão, foi demonstrado prejuízo no relaxamento nas artérias pulmonares em resposta ao doador de NO nitroprussiato de sódio (Delbin et al., 2007). Estudos de Pinsky e colaboradores (1995) evidenciam que a isquemia e reperfusão pulmonar induz a diminuição dos níveis de GMPc no tecido pulmonar. Ademais, os níveis de GMPc também estão reduzidos na hipoxia crônica nas células de músculo liso vascular pulmonar (Peng et al., 1997).

Outro fator avaliado na reatividade vascular de animais submetidos à iIR foi a resposta contrátil. E assim como observado na resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio, a isquemia intestinal não alterou a resposta vasoconstritora à

fenilefrina em artéria mesentérica superior de ratos. Porém, nos anéis de artéria pulmonar a iIR prejudicou a resposta contrátil à fenilefrina, levando a uma redução desta quando comparada à resposta observada nas artérias dos animais SHAM. Na literatura, essa hiporreatividade vascular foi descrita em artéria mesentérica superior de ratos Sprague-Dawley, submetidos a 40 minutos de isquemia e 300 minutos de reperfusão do leito mesentérico (Chen et al., 2006). Além disso, no modelo de isquemia e reperfusão pulmonar, também foi evidenciada diminuição da resposta a agonistas α -adrenérgicos em artéria pulmonar de ratos submetidos a isquemia e reperfusão quando comparados aos controles (Delbin et al., 2007). Por outro lado, Köksoy e colaboradores (2000) publicaram que a resposta vasomotora à fenilefrina estava aumentada em artéria pulmonar de ratos após 60 minutos de isquemia e 240 minutos de reperfusão de mesentérica (Köksoy et al., 2000). Essa divergência de resultados pode estar relacionada com a diferença de modelos de isquemia e reperfusão, em que o tempo de isquemia e reperfusão pode ser um fator que interfira na resposta vasomotora aos agonistas α -adrenérgicos.

Com relação à resposta contrátil, sabe-se que a estimulação excessiva de receptores adrenérgicos pelas catecolaminas pode gerar dessensibilização da resposta mediada por esses receptores (Zanescio et al., 1997). Adicionalmente, a exposição crônica a um agonista pode causar desacoplamento entre o receptor e as proteínas efetoras e/ ou uma diminuição na regulação desse receptor (Stiles et al., 1984). Por conseguinte, Wallach e colaboradores (1980) sugeriram que em situações de isquemia e reperfusão, como no caso da cirurgia cardíaca, ocorre elevação dos níveis plasmáticos de catecolaminas. Assim, é possível especular que o prejuízo na resposta a fenilefrina, encontrado nos anéis de artéria pulmonar de animais submetidos a iIR, seja devido a uma dessensibilização da resposta contrátil mediada por receptores α -adrenérgicos.

Tanto na artéria mesentérica superior como na artéria pulmonar, o endotélio modulou a resposta contrátil à fenilefrina. Porém, nos anéis de artéria mesentérica superior, onde a iIR não ocasionou alteração na resposta à fenilefrina, a retirada do endotélio não teve um efeito diferencial quando os grupos avaliados foram comparados. Esse fato demonstra que, na artéria mesentérica, a iIR não altera a modulação endotelial sobre a contração em resposta à fenilefrina. Por outro lado, na artéria pulmonar, o endotélio modulou negativamente a resposta contrátil, devido ao aumento na liberação de fator(es) vasodilatador(es) produzido(s) pelo endotélio em decorrência da estimulação α -adrenérgica. Sendo assim, a retirada mecânica do endotélio na artéria

pulmonar igualou a contração induzida pela fenilefrina entre os grupos SHAM e IR. Esse conjunto de resultados mostrou que a iIR ocasionou efeito antagônico na artéria pulmonar, uma vez que o endotélio perdeu sua habilidade em liberar fator(es) vasodilatador(es) em resposta ao agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina e/ou em manter sua biodisponibilidade.

O NO é o principal fator de relaxamento derivado do endotélio em condições fisiológicas (Mombouli; Vanhoutte, 1999; Vanhoutte, 1996) e é um potencial sinalizador na iIR que liga as alterações locais às alterações sistêmicas (Cavriani et al., 2004; Ward et al., 2000; Yasmin et al., 1997). Assim, investigou-se no presente estudo se existia participação do NO nas alterações da reatividade vascular observadas na artéria pulmonar dos animais submetidos a iIR. Os resultados apresentados sugerem que o NO está envolvido tanto na disfunção vasodilatadora quanto na vasoconstritora observadas na artéria pulmonar, uma vez que essas disfunções foram inibidas na presença do L-NAME, um inibidor não-seletivo das isoformas da sintase de óxido nítrico (NOS). Porém, cabe salientar que a modulação nitrérgica sobre a resposta contrátil ocorre de maneira diversa daquela sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Ou seja, quando avaliada a resposta contrátil à fenilefrina, observa-se um aumento da modulação nitrérgica, enquanto que essa modulação foi reduzida quando se estimulou o endotélio com o agonista muscarínico acetilcolina. Com relação à resposta vasodilatadora dependente do endotélio, Köksoy e colaboradores (2000) demonstraram uma menor modulação do NO sobre a pressão de perfusão média no leito vascular pulmonar de ratos submetidos a iIR, o que sugere uma menor participação nitrérgica basal nas artérias pulmonares após a iIR. Coelho e colaboradores (2007), por sua vez, evidenciaram que a iIR provoca hiporreatividade ao agente contrátil metacolina em brônquios de ratos, a qual foi bloqueada com a inibição da isoforma induzível da NOS (iNOS). Esses resultados estão de acordo com o resultado obtido na função vasoconstritora de artéria pulmonar de ratos IR.

A iNOS é a isoforma da NOS que está envolvida na resposta imune e, quando estimulada, produz grandes quantidades de NO durante longos períodos de tempo, como um mecanismo de defesa (Bryan et al., 2009). Além disso, essa enzima é citosólica, independente de cálcio, pois já está ligada à calmodulina, e sua indução é inibida por glicocorticóides (Moncada et al., 1991a). A iNOS tem sido encontrada em muitos tipos de células, como macrófagos e neutrófilos, e é imunologicamente ativada pela exposição a endotoxina bacteriana ou citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 e o

TNF- α (Bryan et al., 2009). Sabe-se que uma superprodução de NO pode resultar em vasodilatação durante a sepse, hipovolemia, hipoxia e falência múltipla de órgãos (Roerig et al., 2000 apud Bryan et al., 2009). Adicionalmente, alguns trabalhos demonstram que a produção excessiva de NO por meio da ativação da iNOS contribui para a fisiopatologia da iIR (Coelho et al., 2007; Cuzzocrea et al., 2002; ; Montalto et al., 2003; Ward et al., 2000; Zhou et al., 2003). Tendo sido também observado que a inflamação induzida pela iIR em ratos resulta em estresse oxidativo e nitrosoativo, caracterizado pela alta produção de NO via aumento na expressão da iNOS (Naito et al., 2004).

Assim, com a intenção de avaliar a participação do NO proveniente da iNOS na modulação da vasodilatação e da vasoconstrição na artéria pulmonar após a iIR, realizou-se incubação dos anéis com o 1400W, inibidor seletivo da iNOS. A hiporreatividade à fenilefrina observada nos anéis de artéria pulmonar de ratos submetidos a iIR foi associada a um aumento de NO derivado da iNOS, uma vez que essa hiporreatividade foi revertida com o uso do 1400W. Em ratos submetidos a choque hemorrágico e reposição volêmica, a hiporreatividade contrátil em artéria mesentérica também era revertida pelo uso de 1400W na solução de reposição volêmica dos animais (Savoye et al., 2005). Adicionalmente, no modelo de iIR, demonstrou-se que a hiporreatividade brônquica era revertida após o uso de aminoguanidina, um inibidor da iNOS (Coelho et al., 2007). Em conjunto, os resultados sugerem que uma superprodução de NO via ativação da iNOS é responsável pela redução da resposta contrátil à fenilefrina em anéis de artéria pulmonar de ratos submetidos a iIR.

Além da participação da iNOS na resposta contrátil, os presentes resultados demonstram que essa enzima está associada à diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio induzida pela acetilcolina. Essa afirmação baseia-se no fato de que a inibição da iNOS, com o uso do 1400W, aumentou a vasodilatação em resposta à acetilcolina nos anéis de artéria pulmonar de ratos submetidos a iIR. Assim, nos animais submetidos a iIR, a iNOS modula a função endotelial, prejudicando a vasodilatação dependente do endotélio e inibindo a resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo α_1 -adrenérgico fenilefrina, efeitos que caracterizam a iNOS como o mediador dos ajustes de reatividade vascular com ações antagônicas na artéria pulmonar.

Dentre os fatores que induzem a lesão intestinal depois da reperfusão, estão os radicais livres, espécies que têm um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell, 1987). As espécies reativas do oxigênio incluem todos os radicais do oxigênio, como o

ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($HO^\cdot$), dentre outros (Barber; Bernheim, 1967; Change et al., 1979). Por sua vez, dentre as espécies reativas de nitrogênio estão incluídos além do peroxinitrito ($ONOO^-$), o NO e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2) (Eiserich et al., 1998; Hogg; Kalyanaraman, 1999).

Na iIR, a redução tetravalente da molécula de oxigênio pela mitocôndria leva à formação de água; entretanto, de 1 a 2% das moléculas de oxigênio escapam dessa via e sofrem redução univalente, gerando radicais livres de oxigênio. Em condições normais, esses radicais são neutralizados pelas enzimas antioxidantes, mas durante a reperusão, uma excessiva concentração de radicais livres é gerada, provocando o processo de estresse oxidativo (Yoshida, 1996). Isso ocorre porque durante a isquemia há a conversão irreversível da xantina desidrogenase (XD) em xantina-oxidase (XO), enzima que depende de oxigênio para metabolizar a hipoxantina. Na isquemia, a hipoxantina está aumentada devido à degradação dos estoques de ATP; quando o oxigênio é fornecido pela reperusão, a hipoxantina é metabolizada gerando subprodutos como o urato e as espécies reativas O_2^- e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Granger, 1988). Fisiologicamente, a enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por catalisar a conversão do O_2^- em H_2O_2 , enquanto a enzima catalase converte o H_2O_2 em água e oxigênio (O_2). Entretanto, na presença de íons de ferro ou cobre, pode haver a conversão do peróxido de hidrogênio no $HO^\cdot$, que é altamente reativo e citotóxico (Granger, 1988; Yoshida, 1996).

Os radicais livres, em particular o $HO^\cdot$, iniciam a peroxidação das membranas celulares, liberando ácido araquidônico e radicais lipídicos peroxil. O ácido araquidônico é metabolizado pela cicloxigenase em tromboxano e prostaglandinas, ou pela lipoxigenase (Yoshida, 2002). O radical peroxila promove a peroxidação lipídica, que acontece pelo ataque a um lipídio insaturado, suficientemente reativo para extrair um átomo de hidrogênio (Lima; Abdalla, 2001), formando um radical de carbono. O radical de carbono pode reagir com O_2 para formar outro radical peroxila. Esse último propaga a peroxidação lipídica, abstraindo o hidrogênio de um lipídio insaturado vizinho enquanto é convertido a um hidroperóxido (LOOH) (Lima; Abdalla, 2001). Esses, quando formados, podem também reagir com íons de ferro ou cobre, gerando radical alcóxila de maneira semelhante à formação de radical hidroxila por H_2O_2 na reação de Fenton (Lima; Abdalla, 2001). O radical alcóxila, por sua vez, pode propagar a peroxidação lipídica para outras moléculas de ácidos graxos (Lima; Abdalla, 2001). A presença de LOOH em membranas altera sua fluidez devido ao aumento da

hidrofilicidade, o que modifica suas propriedades físico-químicas (Girotti, 2008). Sabe-se que a peroxidação lipídica está relacionada à aterosclerose, à neurodegeneração, ao câncer e a outras doenças (Bryan et al., 2009; Halliwell, 2007). As espécies reativas também são prejudiciais por serem capazes de alterar proteínas pelo mecanismo de Nitração e S-nitrosação, que ocorre pela adição de um grupamento NO ao radical tiol de um resíduo de cisteína, formando nitrosotiol (Bryan et al., 2009). É conhecido que alterações nos níveis sanguíneos de nitrosotiol estão associadas a processos patológicos, como hipertensão arterial e resistência a insulina (Bryan et al., 2009).

O O_2^- , através da rápida reação com NO, pode levar à formação de peroxinitrito, uma espécie também reativa e citotóxica. Em uma via independente de metal, o peroxinitrito é rapidamente decomposto pela isomerização a nitrato e ânion hidroxila ou, quando protonado, a radicais nitrito e hidroxila, ambos mais reativos que os precursores do peroxinitrito (Pfeiffer et al., 1997; Coddington et al., 1999). Sobre o papel dessa substância no pulmão, Zhou e colaboradores (2003) inferiram que a lesão pulmonar por iIR em ratos é provocada pelo aumento do NO e da produção de peroxinitrito. Esses pesquisadores demonstraram que a inibição da iNOS pelo tratamento com aminoguanidina (inibidor da iNOS), 15 minutos antes da reperusão, previne a lesão pulmonar e diminui a formação de peroxinitrito no pulmão de ratos submetidos a iIR (Zhou et al., 2003).

No presente trabalho, a redução da vasodilatação em resposta à acetilcolina em artérias pulmonares ocasionada pela iIR, bem como a reversão dessa resposta pelo uso do 1400W, levanta a hipótese de que a isquemia intestinal aumenta a atividade da iNOS em artérias pulmonares, o que leva a uma maior produção de NO. O NO, por sua vez, reage com O_2^- originado na reperusão, formando assim o peroxinitrito, que pelo seu mecanismo citotóxico reduz a resposta vasodilatadora endotelial estimulada pelo agonista muscarínico acetilcolina. Contribuindo com essa hipótese, Savoye e colaboradores (2005) demonstram que a condição de choque e reposição volêmica reduziu as respostas contrátil e vasodilatadora em artéria mesentérica, as quais foram revertidas após a ressuscitação dos animais com solução contendo 1400W ou mercatopropionil glicina, um sequestrador não-seletivo de radicais livres (Savoye et al., 2005).

Como já citado anteriormente, as isoformas nNOS e eNOS são constitutivamente presentes em diferentes células e tecidos, enquanto a iNOS não é normalmente expressa, exceto em situações inflamatórias (Nathan, 1997). A expressão

de iNOS em diferentes células e tecidos pode ser rapidamente regulada após a exposição a lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e citocinas pró-inflamatórias tais como a IL-1 ou TNF- α (Kleinert et al., 2004). Essa regulação acontece via ativação do fator de transcrição NF-kB, envolvido na regulação de muitas citocinas e enzimas pró-inflamatórias (Ghosh et al., 1998; Hecker et al., 1996; Schini-Kerth et al., 1994; Xie et al., 1994). Na inflamação, o NF-kB controla a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias, como a iNOS (Ghosh et al., 1998). Sabe-se que o NF-kB pode ser constitutivamente ativo em algumas células em um nível baixo, mas a maior parte do fator encontra-se no citoplasma em um estado inativo, e ligado a um potente inibidor, iKB (Baeuerle; Baltimore, 1988; Ghosh et al., 1998). A estimulação de células com um agonista que ativa o NF-kB conduz a uma série de sinais bioquímicos, resultando na fosforilação, ubiquitinação e degradação de iKBs, com consequente liberação do NF-kB para a translocação nuclear; no núcleo, o NF-kB pode exacerbar a transcrição de genes específicos (Ghosh et al., 1998, Ortego et al., 2005). O papel essencial do NF-kB na expressão de iNOS é sugerido pela demonstração de que a supressão dos sítios de ligação kB na região promotora de iNOS faz com que o gene não responda ao estímulo por citocina (Chartrain et al., 1994).

É descrito que o NO em baixas concentrações é um supressor do NF-kB (Colasanti; Persichini, 2000). Assim, situações com queda da concentração do NO podem favorecer a ativação local de NF-kB e assim induzir a expressão de genes inflamatórios dependente de NF-kB, incluindo-se a expressão de iNOS. Nesse sentido, QU e colaboradores (2000) demonstraram que, em ratos com intestino normal, a nNOS suprime a expressão gênica de iNOS por meio de uma redução da atividade do NF-kB. Adicionalmente, especula-se que um desbalanço do NO faça parte do processo fisiopatológico da iIR. Acredita-se que a perda do balanço entre as atividades das sintases de NO constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS) pode ser uma das causas dos prejuízos ocasionados pela iIR (Cavriani et al., 2004; Ward et al., 2000; Yasmin et al., 1997), tendo sido sugerido que ao longo da reperfusão ocorre queda da produção de NO proveniente da cNOS, o que acarreta na resposta inflamatória sistêmica (Ward et al., 2000). Assim, parece razoável sugerir que uma queda de NO poderia favorecer a ativação de NF-kB e assim aumentar a expressão gênica da iNOS.

Desse modo, uma diminuição na biodisponibilidade do NO na resposta vasodilatadora à acetilcolina na artéria pulmonar após iIR pode estar associada a uma menor produção de NO via eNOS, com uma produção aumentada de espécies reativas

via iNOS. Alguns trabalhos descrevem alterações na expressão das NOS na iIR (Naito et al., 2006; Naito et al., 2006; Savoye et al., 2005), tendo sido observado que a iIR em intestino de ratos diminui a expressão proteica da eNOS (Naito et al., 2006), assim como aumenta a expressão de mRNA da iNOS (Naito et al., 2004; Savoyne et al., 2005).

Os presentes resultados sugerem a importância de futuros estudos que busquem elucidar o papel do sistema vascular e os mecanismos envolvidos na sinalização dos ajustes de reatividade vascular nas complicações induzidas pela iIR.

Com relação ao tratamento da isquemia intestinal, de maneira geral, procura-se restabelecer fluxo no intestino ainda viável, geralmente com revascularização da artéria mesentérica e ressecção das porções necróticas (Baptista-Silva; Souza-Moraes, 2006). Entretanto, há situações em que o tratamento cirúrgico se impõe, porém, isoladamente, é insuficiente para a completa resolução da afecção, visto que a reperfusão intestinal traz danos teciduais e sistêmicos que devem ser evitados (Santos et al., 2006). Assim, inúmeras substâncias têm sido estudadas com o objetivo de evitar ou minimizar os efeitos maléficos da iIR. Dentre essas, podemos citar: antioxidantes endógenos enzimáticos hidrossolúveis (SOD, catalase, glutathione peroxidase), lipossolúveis (tocoferóis, carotenóides, quinonas), alopurinol, entre outras (Ribeiro; Yoshida, 2005). Santos e colaboradores (2003) demonstraram que o propofol (2,6 diisopropilfenol) infundido durante o processo de iIR (20 mg/kg/hora) foi capaz de minimizar as lesões da mucosa intestinal ocasionada pela iIR em ratos submetidos à 30 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão, possivelmente devido a sua ação de inibir a peroxidação lipídica (Wolf et al, 2001). A administração de alopurinol (50 mg/kg) mais vitamina C (200 mg/kg) e E (100 mg/kg), por via oral 3 dias antes do processo iIR, diminuiu a lesão tecidual no intestino de animais submetidos a iIR (Kaçmaz et al., 1999). Biondo-Simões e colaboradores (2000) estudaram o uso de eritromicina (50 mg/kg, via oral) administrada previamente à iIR em ratos, não sendo observados benefícios com o uso dessa substância em relação ao grupo controle. Assim, apesar de todo o conhecimento básico adquirido com relação aos radicais livres na isquemia e reperfusão, pouco benefício prático resultou até o presente momento, o que favorece a necessidade de estudos que busquem novas drogas e tratamentos que diminuam as injúrias causadas pela iIR. Assim, sabendo que as estatinas possuem propriedades anti-inflamatórias e

atividade antioxidante, alguns estudos buscam definir os efeitos das estatinas na isquemia intestinal.

Com relação ao tratamento com sinvastatina, alguns estudos demonstraram que a sinvastatina diminui injúrias causadas pela iIR. Nesse sentido, tratamento com sinvastatina (10 mg/kg) imediatamente antes da isquemia e após 24 horas preveniu a destruição da mucosa intestinal e diminui o índice de apoptose no jejuno e íleo em ratos Sprague-Dawley (Sliiper et al., 2010). Além disso, em ratos submetidos a iIR, o tratamento agudo com sinvastatina (10 mg/kg), uma hora antes da isquemia, bloqueou a geração de mediadores inflamatórios, como TNF- α e CINC-1 (citocina induzida por neutrófilo quimioatraente), e preservou a expressão proteica da eNOS, suprimindo assim a inflamação intestinal (Naito et al., 2006). Porém, a questão sobre os efeitos da sinvastatina nos ajustes vasculares ocasionados pela iIR permanece sem resposta. Porém, considerando os efeitos benéficos das estatinas sobre o sistema cardiovascular, como descrito na introdução da presente dissertação, levantou-se a hipótese de que na isquemia intestinal, como em outras doenças cardiovasculares, as estatinas poderiam melhorar a função endotelial da artéria pulmonar, exercendo ações que aumentariam a biodisponibilidade de NO e/ ou ações antioxidantes e anti-inflamatórias.

Os resultados obtidos satisfatoriamente evidenciaram que a sinvastatina é um fármaco benéfico nas alterações de reatividade vascular ocasionadas pela iIR. O pré-tratamento com sinvastatina (20 mg/kg), 1 hora antes da iIR, preveniu o prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio na artéria pulmonar ocasionada pela iIR. Do mesmo modo, esse pré-tratamento também foi eficaz em prevenir a hiporreatividade contrátil à fenilefrina ocasionada pela iIR. Assim, alterações que eram bloqueadas pela inibição não seletiva da NOS como da iNOS, com a incubação dos anéis vascular com o L-NAME ou o 1400W, respectivamente, foram bloqueadas também pelo pré-tratamento agudo com sinvastatina. Sugerindo, dessa maneira, que a sinvastatina exerce ação anti-inflamatória e/ ou anti-oxidante a(s) qual(ais) levariam a um aumento da síntese de NO via cNOS e uma redução de sua síntese por meio da ativação da iNOS na artéria pulmonar de ratos submetidos a iIR. Hipótese essa que será estudada por nosso grupo.

Dentre os efeitos pleiotrópicos das estatinas, as ações anti-inflamatórias estão sendo evidenciadas. Vários estudos têm descrito os efeitos benéficos das estatinas em diminuir os níveis de moléculas de adesão (Bernot et al., 2003; Landsberger et al., 2006; Weber et al., 1997; Zapolska-Downar et al., 2004) e em reduzir a secreção de citocinas

pró-inflamatórias encontradas no plasma, assim como de IL-6, IL-1 β e TNF- α (Hsu et al. 2005). Fatores inflamatórios estes que, como descrito anteriormente, contribuem com a fisiopatologia das complicações decorrentes da iIR (Cavriani et al., 2005; Coelho et al., 2007; Deitch, 2001).

Atualmente, são conhecidos os efeitos benéficos das estatinas na função endotelial, sendo que alguns trabalhos demonstram que a estatina melhora a biodisponibilidade do NO (Alvarez De Sotomayor et al., 2000; Fatehi-Hassanabad et al., 2006; Rossoni et al., 2011; Tawfik et al., 2006). Outros trabalhos demonstram que as estatinas exercem papel antioxidante na função vascular, diminuindo a formação de espécies reativas ou modulando mecanismos moleculares em resposta às espécies reativas (Murrow et al., 2012; Ortego et al., 2005; Tawfik et al., 2006). A pré-incubação de células de músculo liso vascular com sinvastatina (10^{-7} - 10^{-5} mol/L), por exemplo, diminui a ativação do NF-kB induzida por O $_2^-$ em meio de cultura de células de músculo liso vascular (Ortego et al., 2005). Em outro estudo, ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, tiveram melhora do relaxamento em resposta a acetilcolina na artéria coronária interventricular após tratamento com sinvastatina (5 mg/kg/dia, *p.o.*) administrada por 4 ou 10 semanas (Tawfik et al., 2006). Nesse trabalho, a melhora no relaxamento foi acompanhada por uma maior formação de NO e por uma menor formação de peroxinitrito por células endoteliais de artéria coronária, obtendo-se, portanto, aumento na produção e biodisponibilidade de NO (Tawfik et al., 2006). Além dos resultados das pesquisas com animais, em humanos o tratamento com atorvastatina também melhorou a função endotelial, avaliada pela dilatação da artéria braquial mediada por fluxo (Murrow et al., 2012). Tendo sido demonstrado que as estatinas também possuem papel antioxidante na função vascular de humanos, como em um estudo duplo-cego, onde o tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/ 12 semanas) de pacientes com dislipidemia, síndrome metabólica e/ ou diabetes reduziu os níveis plasmáticos de lipoproteína de baixa densidade e de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, formados como um subproduto da peroxidação lipídica) (Murrow et al., 2012).

Dessa forma, os presentes resultados apontam para a importância de um aprofundamento dos estudos que buscam elucidar os mecanismos pelos quais a sinvastatina age melhorando a reatividade vascular na IR.

A sinvastatina emerge como um fármaco de grande relevância clínica para o tratamento da iIR, pois com apenas uma única dose, uma hora antes da oclusão da

artéria mesentérica superior, a mesma reverteu as alterações de reatividade vascular desencadeadas por essa doença. Sendo assim, com base nos resultados deste trabalho, pode-se sugerir que pacientes vítimas de traumas ou com suspeita de interrupção do fluxo intestinal por trombo poderiam se beneficiar do uso de uma única dose de sinvastatina, assim que chegassem ao pronto-socorro, como uma manobra pré-operatória.

6 CONCLUSÃO

Confirmando a primeira hipótese da presente dissertação, pode-se concluir que a iIR modificou a reatividade vascular em artéria pulmonar, porém não modificou a reatividade vascular em artéria mesentérica superior. Na artéria pulmonar, a iIR causou disfunção endotelial por meio de ativação da iNOS, a qual levou à diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e à hiporreatividade contrátil. Além disso, confirmando a segunda hipótese, uma única dose de sinvastatina antes da iIR previne as alterações de reatividade vascular, o que demonstra o efeito benéfico desse fármaco na isquemia intestinal, possivelmente por sua ação anti-inflamatória e/ ou anti-oxidante.

REFERENCIAS*

- Alvarez De Sotomayor M, Herrera MD, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Characterization of endothelial factors involved in the vasodilatory effect of simvastatin in aorta and small mesenteric artery of the rat. *Br J Pharmacol*. 2000 Nov;131(6):1179-87.
- Aprahamian CJ, Lorenz RG, Harmon CM, Dimmit RA. Toll-like receptor 2 is protective of ischemia-reperfusion-mediated small-bowel injury in a murine model. *Pediatr Crit Care Med*. 2008 Jan;9(1):105-9.
- Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*. 1988 Oct 28;242(4878):540-6.
- Banda MA, Lefer DJ, Granger N. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997 Dec;273(6 Pt 2): H2721-H5.
- Bao N, Usfikoshi H, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Iwasa M, Yamaki T, Sumi S, Nagashima K, Aoyama T, Kawasaki M, Nishigaki K, Takemura G, Minatoguchi S. Simvastatin reduces myocardial infarct size via increased nitric oxide production in normocholesterolemic rabbits. *J Cardiol*. 2009 Feb;53(1):102-7.
- Baptista-Silva JCC, Souza-Moraes MR. Isquemia intestinal aguda. In: Lopes, AC (Org.). *Diagnóstico e tratamento*. 1 ed. Barueri: Manole Ltda, 2006;2: 82-5.
- Barber AA, Bernheim F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Res*. 1967;2: 355-403.
- Berkels R, Nouri SK, Taubert D, Bartels H, Roesen P, Roesen R, Klaus W. The HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin enhances the nitric oxide bioavailability of the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Sept;42(3):356-63.
- Bernot D, Benoliel AM, Peiretti F, Lopez S, Bonardo B, Bongrand P, Juhan-Vague I, Nalbone G. Effect of atorvastatin on adhesive phenotype of human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alpha. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Feb;41(2):316-24.
- Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004 Feb;202(2):145-56.
- Bian K, Doursout MF, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens*. 2008 Apr;10(4):304-10.
- Biccard BM, Sear JW, Foex P. Statin Therapy: a potentially useful perioperative intervention in patients with cardiovascular disease. *Anesthesia*. 2005; 60: 1106-14.
- Biondo-Simões MLP, Greca FH, Ioshi S, Tawil IIE, Menini CM, Rampazzo JC. The influence of antibiotics on intestinal ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Acta Cir Bras* 2000; 15(3): 83-7.
- Brandt LJ, Boley SJ. AGA technical review on intestinal ischemia. *American Gastrointestinal Association. Gastroenterology*. 2000;118 (5): 954-68.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

- Bravo L, Herrera MD, Marhuenda E, Perez-Guerrero C. Cardiovascular effects of lovastatin in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Gen Pharmacol*. 1998 Mar;30(3):331-6.
- Breithaupt-Faloppa AC, Vitoretti LB, Cavriani G, Lino-Dos-Santos-Franco A, Sudo-Hayashi LS, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-Lima W. Intestinal lymph-borne factors induce lung release of inflammatory mediators and expression of adhesion molecules after an intestinal ischemic insult. *J Surg Res*. 2012 Jul;176(1):195-201.
- Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, Rodrigues-Díez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin prevents Angiotensin II- Induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension*. 2009; 54(1):142-9.
- Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci*. 2009 Jan 1;14:1-18.
- Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg*. 1986; 121:199-206.
- Cavriani G, Domingos HV, Soares AL, Trezena AG, Ligeiro-Oliveira AP, Oliveira-Filho RM, Sudo-Hayashi LS, Tavares de Lima W. L. Lymphatic system as a path underlying the spread of lung and gut injury after intestinal ischemia/ reperfusion in rats. *Shock*. 2005;23(4): 330-6.
- Cavriani G, Oliveira-Filho RM, Trezena AG, Silva ZL, Domingos HV, Arruda MJC, et al. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2004;494: 241-9.
- Change B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev*. 1979; 59 (3): 527-605.
- Chartrain NA, Geller D A, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett J S. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem*. 1994; 269: 6765–72.
- Chen CF, Leu FJ, Chen HI, Wang D, Chou SJ. Ischemia/reperfusion-induced low reactivity of the rat superior mesenteric vascular bed is associated with expression of nitric oxide synthases. *Transplant Proc*. 2006;38:2216-20.
- Chiao CW, Tostes RC, Webb RC. P2X7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Sep;326(3):864-70.
- Clark JA, Coopersmith CM. Intestinal crosstalk – a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness. *Shock*. 2007 Oct ;28(4): 384–93.
- Coddington JW, Wherland S, Hurst JK. Pressure dependence of peroxynitrite reactions. Support for a radical mechanism. *Inorg Chem*. 2001 Jan 29; 40(3):528-32.
- Coelho FR, Cavriani G, Soares AL, Teixeira SA, Almeida PC, Sudo-Hayashi LS, Muscará MN, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-Lima W. Lymphatic-borne IL-1beta and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock*. 2007;28(6):694-99.

- Colasanti M, Persichini T. Nitric oxide: an inhibitor of NF-kappaB/Rel system in glial cells. *Brain Res Bull.* 2000; 52:155–61.
- Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Van de Loo FA, Caputi AP, Thiemermann C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock.* 2002 Aug;18(2):169-76.
- Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, Rossoni LV. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res.* 2011 Sept;44(9):920-32.
- Debus ES, Müller-Hülsbeck S, Kölbel T, Larena-Avellaneda A. Intestinal ischemia. *Int J Colorectal Dis.* 2011; 26:1087-97.
- Deitch EA, Adams C, Lu Q, Xu DZ. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability. *Surgery.* 2001;129(1):39-47.
- Deitch EA. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Oct;1207 Suppl 1: E103-E11.
- Deitch EA. Role of gut lymphatic system in multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care.* 2001 Apr;7(2): 92-8.
- Delbin MA, Moraes C, Camargo E, Mussi RK, Antunes E, Nucci G, Zanesco A. Influence of physical preconditioning on the responsiveness of rat pulmonary artery after pulmonary ischemia/reperfusion. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;147(3):793-8.
- Dibazar F, Hajipour B, Hosseini MM, Hemmati MR, Ghandiha A. Simvastatin decreases hepatic ischaemia/reperfusion-induced liver and lung injury in rats. *Folia Morphol.* 2008; 67(4):231-5.
- Edgerton C, Crispín JC, Moratz CM, Bettelli E, Oukka M, Simovic M, Zacharia A, Egan R, Chen J, Dalle Lucca JJ, Juang YT, Tsokos GC. IL-17 producing CD4+ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *Clin Immunol.* 2009 Mar;130(3):313-21.
- Eiserich J P, Patel R P, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec Aspects Med.* 1998;19:221-357.
- Fatehi-Hassanabad Z, Imen- Shahidi M, Fatehi M, Farrokhfall K, Parsaei H. The beneficial in vitro effects of lovastatin and chelerythrine on relaxatory response to acetylcholine in the perfused mesenteric bed isolated from diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 27;535(1-3):228-33.
- Flemming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch.* 2010 May; 459(6):793-806.
- Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113: 1708-14.
- Forstermann U, Nakane M, Tracy WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J.* 1993; 14 Suppl 1: 10-5.
- Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012; 33: 829-37.

- Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Eur J Physiol.* 2010; 459: 923-39.
- Gelosa P, Cimino M, Pignieri A, Tremoli E, Guerrini U, Sironi L. The role of HMG-CoA reductase inhibition in endothelial dysfunction and inflammation. *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3(5): 567-77.
- Ghosh S, May M J, e Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 225–60.
- Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med.* 2008 Mar 15;44(6):956-68.
- Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med.* 2003 Dec 8;115 Suppl 8A:99S-106S.
- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994 May; 81(5):637-47.
- Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Heart Circ Physiol.* 1988 Dec;255(6 Pt 2):H1269-H75.
- Hajipour B, Somi MH, Saberifar F, Hemmati MR, Asl NA, Moein A, et al. Simvastatin attenuates intestinal ischaemia/ reperfusion-induced injury in rat. *Folia Morphol.* 2009;68(3):156-62.
- Halliwell B. Oxidants and human disease: Some new concepts. *Faseb.* 1987; 1:358-64.
- Harris MB, Blackstone MA, Sood SG, Li C, Goolsby JM, Venema VJ, Kemp BE, Venema RC. Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Aug; 287(2): H560-H6.
- Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Wesbrodt NW, Moore FA. Post-Injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock.* 2001;15(1): 1-10.
- Hecker M, Preiss C, Schini-Kerth VB, Busse R. Antioxidants differentially affect nuclear factor kappa B-mediated nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1996 Feb 19;380(3):224-8.
- Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411(2-3): 378-84.
- Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1993 Apr; 74 (4): 1515-20.
- Hsu HY, Wang PY, Chen YT, Sheu WH, Hu HH, Sheng WY. Changes in flow-mediated dilatation, cytokines and carotid arterial stenosis during aggressive atorvastatin treatment in normocholesterolemic patients. *J Chin Med Assoc.* 2005 Feb;68(2):53-8.
- Kaçmaz M, Oztürk HS, Karaayvaz M, Güven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg.* 1999 Dec;42(6):427-31.
- Kannan KB, Colorado I, Reino D, Palange D, Lu Q, Qin X, Abungu B, Watkins A, Caputo FJ, Xu DZ, Semenza GL, Deitch EA, Feinman R. Hypoxia-inducible factor plays a gut-injurious role in intestinal ischemia reperfusion injury. 2011 May; 300(5):G853-G61.

- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500: 255–66.
- Kocsis GF, Pipis J, Fekete V, Kovács-Simon A, Odendaal L, Molnár E, Giricz Z, Janáky T, Rooyen J, Csont T, Ferdinandy P. Lovastatin interferes with the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning and postconditioning in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 May; 294(5):H2406-H9.
- Landsberger M, Wolff B, Jantzen F, Rosenstengel C, Vogelgesang D, Staudt A, Dahm JB, Felix SB. Cerivastatin reduces cytokine-induced surface expression of ICAM-1 via increased shedding in human endothelial cells 2007. *Atherosclerosis.* Jan;190(1):43-52.
- Köksoy C, Kuzu MA, Ergün H, Demirpençe E, Zülfiyaroglu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg.* 2000; 231(1): 105-11.
- Lai IR, Chang KJ, Tsai HW, Chen CF. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction. *Transplantation.* 2008; 85: 732-8.
- Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ. Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation.* 1999 Jul 13;100(2):178-84.
- Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharmaceutical Sciences.* 2001set/dez; 37(3):293-303.
- Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil.* 2005 Sep-Oct;26(5):383-91.
- Magnotti LJ, Upperman JS, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. *Ann Surg.* 1998 Oct;228(4):518-27.
- Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation.* 2000; 101: 207-13.
- Mombouli J, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:61-74.
- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991 Aug; 21(4):361-74.(b)
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun; 43:109-42.(a)
- Mongardon N, Dyson A, Singer M. Is MOF an outcome parameter or a transient, adaptive state in critical illness? *Cur Opin Crit Care.* 2009 Oct; 15(5): 431-36.
- Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jul;285(1):G197-G206.
- Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffl WL, Banerjee A. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma.* 1994 Dec; 37(6): 881-887.

- Moyna NM, Thompson PD. The effect of physical activity on endothelial function in man. *Acta Physiol Scand*. 2004 Feb; 180 (2):113-123.
- Murrow JR, MD*, Sher S, Sarfraz Ali, Uphoff I, Patel R, Porkert M, Ngoc-Anh Le, Jones D, Quyyumi AA. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: Atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol* . 2012 Feb; 6: 42–9.
- Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga C, Mulligan MS. Sinvastatin ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 126 (2): 482-9.
- Naito Y, Takagi T, Ichikawa H, Tomatsuri N, Kuroda M, Isozaki Y, Katada K, Uchiyama K, Kokura S, Yoshida N, Okanou T, Yoshikawa T. A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Nitric Oxide*. 2004 May;10(3):170-7.
- Naito Y, Takagi T, Tsuboi H, Kuroda M, Handa O, Kokura S, et al. Rouvastatin reduces rat intestinal eschemia-reperfusion injury associated with the preservation of endothelial nitric oxide synthase protein. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(13): 2024-30.
- Napoli C, Ignarro LJ. Nitric Oxide and Pathogenic Mechanisms Involved in the Development of vascular Diseases. *Arch Pharm Res*. 2009;32(8): 1103-08.
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest*. 1997; 100 (10): 2417–23.
- Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, Takagi A, Ishizuka N, Hagiwara N, , Kawana M, Kasanuki H. Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolaemic subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Oct; 54(4): 395-9.
- Ortego M, Gómez-Hernández A, Vidal C, Sánchez-Galán E, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Tuñón J, Diaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 May;45(5):468-75.
- Paraskevas KI, Athyros VG, Briana DD, Kakafika AL, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Statins exert multiple beneficial effects on patients undergoing percutaneous revascularization procedures. *Curr Drug Targets*. 2007; 8: 942-51.
- Paraskevas KI. Applications of statins in cardiothoracic surgery: more than just lipid-lowering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008; 33: 377-90.
- Paterno F, Longo WE. The etiology and pathogenesis of vascular disorders of the intestine. *Radiol Clin N Am*. 2008; 46: 877-85.
- Peng W, Hoidal JR, Karwande SV, Farrukh IS. Effect of chronic hypoxia on K⁺ channels: regulation in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1997 Apr; 272(4 Pt 1):C1271-C8.
- Pérez-Guerrero C, Alvarez de Sotomayor M, Herrera MD, Marhuenda E. Endothelium modulates contractile response to simvastatin in rat aorta. *Z Naturforsch C*. 2000 Jan-Feb;55(1-2):121-4.
- Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-

dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7;272(6):3465-70.

- Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, Naka Y, Chen JX, Connolly ES Jr, Stern DM. Hypoxia and modification of the endothelium: implications for regulation of vascular homeostatic properties. *Semin Cell Biol.* 1995 Oct;6(5):283-94.

- Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, Yücel M, Ozen O, Candan S, Arslan G. Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to Intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Anesth Analg.* 2006 Jan; 102: 225-32.

- Qu XW, Wang H, De Plaen IG, Rozenfeld RA, Hsueh W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB J.* 2001 Feb;15(2):439-46.

- Renner P, Kienle K, Dahlke MH, Heiss P, Pfister K, Stroszczynski C, Piso P, Schlitt HJ. Intestinal ischemia: current treatment concepts. *Langenbecks Arch of Surg.* 2011 Jan; 396 (1):3–11.

- Ribeiro ME, Yoshida WB. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: ftopatologia e modelos experimentais. *J Vasc Br.* 2005;4(2):183-94.

- Roerig, S.; Wolf, R.; Grisham, M. B. nitric oxide, Chronic Joint Inflammation, and Pain. In: Ignarro LJ. (ed.) *Nitric Oxide Biology and Pathobiology.* San Diego: Academic Press; 2000. Cap.53, p.873-94.

- Rossoni LV, Wareing M, Wenceslau CF, Al-Abri M, Cobb C, Austin C. Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. *Clin Sci.* 2011 Nov 1;121(10):449-58.

- Santos CHM, Pontes JCDV, Gomes OM. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. *Rev bras Coloproct.* 2006; 26(1):28-33.

- Savoye G, Tamion F, Richard V, Varin R, Thuillez C. Hemorrhagic shock resuscitation affects early and selective mesenteric artery endothelial function through a free radical-dependent mechanism. *Shock.* 2005 May;23(5):411-6.

- Scannell G, Waxman K, Vaziri ND, Zhang J, Kaupke CJ, Jalali M, Hecht CC. Hypoxia-induced alterations of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res.* 1995 Jul; 59(1): 141-5.

- Schini-kerth VB, Bara A, Muè Isch A, Busse R. Pyrrolidine dithiocarbamate selectively prevents the expression of inducible nitric oxide synthase in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 1994 Nov 14;265(1-2):83-7.

- Senthil M, Watkins A, Barlos D, Xu DZ, Lu Q, Abungu B, Caputo F, Feinman R, Deitch EA. Intravenous injection of trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph causes lung injury that is dependent upon activation of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Ann Surg.* 2007 Nov; 246(5):822-30.

- Slijper N, Sukhotnik I, Chemodanov E, Bashenko Y, Shaoul R, Coran AG, Mogilner J. Effect of simvastatin on intestinal recovery following gut ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int.* 2010 Jan;26(1):105-10.

- Soydan G, Çekiç EG, Tuncer M. Endothelial dysfunction in the mesenteric artery and disturbed Nonadrenergic Noncholinergic relaxation of the ileum due to intestinal ischemia-reperfusion can be prevented by Sildenafil. *Pharmacology.* 2009;84: 61-7.

- Stiles GL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol Rev.* 1984 Apr;64(2):661-743.
- Sun W, Lee TS, Zhu M, Gu C, Wang Y, Zhu y, Shvy JY. Statins activate AMP-Activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation.* 2006 Dec 12; 114(24): 2655-62.
- Szarszoi O, Maly J, Ostadal P, Netuka I, Besik J, Kolar F, Ostadal B. Effect of acute and chronic simvastatin treatment on post-ischemic contractile dysfunction in isolated rat heart. *Physiol. Res.* 2008; 57: 793-6.
- Tang EHC, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Eur J Physiol.* 2010; 459:995–1004
- Tawfik HE, El-Remessy AB, Matragoon S, Ma G, Caldwell RB, Caldwell RW. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 319: 386-95.
- Todorovic Z, Nesic Z, Stojanović R, Basta-Jovanović G, Radojevic-Skodric S, Velicković R, Chatterjee PK, Thiernemann C, Prostram M. Acute protective effects of simvastatin in the rat model of renal ischemia-reperfusion injury: It is never too late for the pretreatment. *J Pharmacol Sci.* 2008 Aug;107(4):465-70.
- Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Nov;28(11):2233-40.
- Virgini-Magalhães CE, Mayall MR. Isquemia mesentérica. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ,* 2009 jan; 8: 70-80.
- Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg.* 2011 Jan; 396(1):13-29.
- Wallach R, Karp RB, Reves JG, Oparil S, Smith LR, James TN. Pathogenesis of paroxysmal hypertension developing during and after coronary bypass surgery: a study of hemodynamic and humoral factors. *Am J Cardiol.* 1980 Oct; 46(4):559-65.
- Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC, Shea-Donohue T. Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2000 Mar;89(1):13-9.
- Wassmann S, Faul A, Hennem B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G. Rapid effect of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res.* 2003 Oct 31;93(9):e98-e103.
- Wayman NS, Ellis BL, Thiernemann C. Simvastatin reduces infarct size in a model of acute myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *Med Sci Monit.* 2003; 9(5): BR195-9.
- Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Nov 1;30(5):1212-7.
- Wolf A, Weir P, Segar P, Stone J, Shield J. Impaired fatty acid oxidation in propofol infusion syndrome. *Lancet* 2001; 357: 606-7.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1994 Feb 18;269(7):4705-8.

- Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res.* 1997 Feb;33(2):422-32.
- Yoshida WB. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: Maffei FHA. Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002. p. 253-8.
- Yoshida WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir Vasc Angiol.* 1996;12;82-95.
- Zanesco A, Spadari-Bratfisch RC, Barker LA. Sino-aortic denervation causes right atrial beta adrenoceptor down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 280(2): 677-85.
- Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kołodziej B, Naruszewicz M. Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci.* 2004 Jul 30;75(11):1287-302.
- Zhang J, Cheng X, Liao YH, Lu B, Yang Y, Li B, Ge H, Wang M, Liu Y, Guo Z, Zhang L. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 Jan; 19(1): 13-21.
- Zhang Z, Bu H, Gao Z, Huang Y, Gao F, Li Y. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats. *Int J Pharm.* 2010 Jul 15;394(1-2):147-53.
- Zheng X, Hu SJ. Effects of simvastatin on cardiohemodynamic responses to ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Heart Vessels.* 2006 Mar; 21(2): 116-23.
- Zhou JL, Jin GH, Yi YL, Zhang JL, Huang XL. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol.* 2003 Jun; 9(6):1318-22.