SAULO FERNANDES DE MATTOS DOURADO

**Avaliação do impacto do diazóxido nas lesões locais e
sistêmicas em animais submetidos a isquemia e
reperfusão intestinal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar
Machado

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da
Silva

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dourado, Saulo Fernandes de Mattos

Avaliação do impacto do diazóxido nas lesões locais e sistêmicas em animais submetidos a isquemia e reperfusão intestinal / Saulo Fernandes de Mattos Dourado - São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Marcel Cerqueira Cesar Machado.

Coorientador: Fabiano Pinheiro da Silva

Descritores: 1.Traumatismo por reperfusão 2.Permabilidade intestinal 3.Intestino delgado 4.Diazóxido 5.Junções íntimas 6.Ciclo-oxigenase 2 7.Insuficiência de múltiplos órgãos 8.Ratos Wistar 9.Citocinas

USP/FM/DBD-007/18

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família, de forma especial:

A minha avó **Didy**, pelo seu constante incentivo a curiosidade e a criatividade

Aos meus **pais**, pelos contínuos exemplos, conselhos e tudo de melhor que
alguém pode ensinar a outra pessoa

À minha esposa, **Raquel**, pela paciência e por aceitar trilhar essa jornada de
vida e projetos, mesmo que fisicamente longe, mas unidos por um sentimento
indescritível e único

Ao meu filho **Caio**, pelo amor puro e contagiante que enche as nossas vidas

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo seu amor, generosidade e misericórdia infinitos.

Ao Prof. Dr. **Marcel Cerqueira Cesar Machado**, por toda a ajuda, aprendizado e pela sua orientação durante essa jornada.

Ao Prof. Dr. **Fabiano Pinheiro da Silva**, pela sua grande colaboração e ensinamentos que me ajudaram a crescer como profissional e pesquisador.

A grande amiga Dra. **Fernanda Paula Cavalcante Araújo**, pela amizade, apoio nesse projeto e pelo estímulo para o contínuo crescimento profissional.

A Dra. **Denise Frediani Barbeiro** e Dr. **Hermes Vieira Barbeiro**, pela ajuda em toda a parte laboratorial, na estatística e por sua amizade.

A Dra. **Márcia Kiyomi Koike**, pela companhia nos experimentos e pela sua pronta disposição em ajudar sempre que precisei.

A Dra. **Suely Kunimi Kubo Ariga**, pela parceria na logística dos animais para os experimentos e todo o apoio que recebi.

Ao setor de patologia do Incor, em especial a Profa. Dra. **Vera Demarchi Aiello**, pela sua valorosa colaboração e excelente trabalho desempenhado na leitura das lâminas histológicas.

A todos os amigos do LIM-51: **Kelli, Geraldo, Fátima, Thais, Rosângela**; e aos **funcionários do biotério**, cuja colaboração, apoio e trabalho foram fundamentais para que esse projeto se tornasse realidade.

À **Faculdade de Medicina da USP** pelo acolhimento através da estrutura física e dos profissionais que me disponibilizou durante a minha jornada de pós-graduação, inclusive a residência médica em Anestesiologia.

A todos os **professores, monitores, residentes e preceptores** da **Universidade de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará**, que compuseram as bases da minha formação profissional.

Aos **amigos paulistanos**, em especial **Aline, Diego, Natália e Rodrigo**, por fazerem parte da nossa vida e nos acolherem com suas casas e suas famílias a alguns bons quilômetros de distância dos nossos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	A circulação intestinal e a isquemia	1
1.2	A função intestinal de barreira.....	3
1.3	Fisiopatologia da I/R e sua amplificação	6
1.4	Translocação bacteriana e passagem de mediadores inflamatórios... ..	10
1.5	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS)	13
1.6	O pré-condicionamento isquêmico	14
1.7	Pré-condicionamento farmacológico e diazóxido	15
2.	OBJETIVOS	17
3.	MÉTODOS	18
3.1	Aspectos éticos.....	18
3.2	Animais de experimentação.....	18
3.3	Cirurgia e indução de I/R intestinal	18
3.4	Delineamento experimental	20
3.5	Administração do diazóxido	21
3.6	Coleta de materiais para análise	21
3.7	Marcadores de lesão no soro	22
3.8	Perfil inflamatório no soro por Milliplex	23
3.9	Marcadores inflamatórios nos tecidos e proteínas das TJ intestinais por expressão gênica.....	24
3.10	Histologia de intestino, fígado e coração	26
3.11	Análise estatística	28
4.	RESULTADOS	30
4.1	Marcador de lesão intestinal no soro - IFABP.....	30
4.2	Dosagem sérica de citocinas	31
4.2.1	TNF α sérica.....	31
4.3	MCP-1 sérica	32
4.4	Expressão de citocinas intestinais	33

4.4.1	Expressão relativa de TNF α intestinal.....	33
4.4.2	Expressão relativa de IL-10 intestinal.....	34
4.4.3	Expressão relativa de IL-6 intestinal.....	35
4.5	Expressão de citocinas hepáticas.....	36
4.5.1	Expressão relativa de TNF α hepático	36
4.5.2	Expressão relativa de IL-10 hepática	37
4.5.3	Expressão relativa de IL-6 hepática	38
4.6	Expressão relativa de COX-2	39
4.6.1	COX intestinal	39
4.6.2	COX-2 hepática.....	40
4.7	Expressão relativa de moléculas das TJ intestinais	41
4.7.1	JAM-A	41
4.7.2	Ocludina	42
4.7.3	ZO-1	43
4.8	Análise histológica	44
4.8.1	Histologia intestinal	44
4.8.2	Histologia hepática	46
4.8.3	Histologia cardíaca.....	47
4.9	Dosagem de transaminases séricas	48
4.9.1	Dosagem sérica de AST	48
4.9.2	Dosagem sérica de ALT	49
4.9.3	Dosagem sérica de troponina	50
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÃO	60
7.	ANEXOS	61
8.	REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
®	Marca registrada
ADP	Disfotato de adenina
ALT	Alanina aminotransferase
AMS	Artéria mesentérica superior
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
	CA California
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
	Co Company
COX	Ciclo-oxigenase
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Gramas
I/R	Isquemia e reperfusão
ICAM	Molécula de adesão celular I
IFABP	Intestinal fatty acid binding protein
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
JAM-A	<i>junction-associated molecule A</i>
KATP	Canais de potássio ATP-dependentes
kg	Quilogramas
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MCP	Monocyte chemoattracting protein
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
mU	Microunidades
ng	Nanogramas
PCR	Protein chain reaction
pg	Picogramas
RNA	Ácido ribonucleico
SIRS	Inflamação sistêmica
SOD	Superóxido-dismutase
SPF	<i>specific-pathogen-free</i>
TJ	<i>Tight junctions</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
U/L	Unidades por litro
USA	Estados Unidos da América

UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volts
W	Wats
XD	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
ZO-1	<i>Zonnula occludens-1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Tight junctions</i> (TJ) e alguns dos seus componentes. Dentre os transmembrana, temos as claudinas (amarelo), ocludinas (laranja) e JAM-A (laranja com preto). Dentro da célula, elas interagem com um complexo de proteínas citoplasmático, a placa citoplasmática, em azul, que se conecta ao citoesqueleto, em preto. Participam ainda do complexo proteínas citoplasmáticas com função sinalizadora (amarelo), reguladores de transcrição em vermelho e proteínas adaptadoras como a ZO-1 (verde), que conectam os demais componentes entre si (verde).....	4
Figura 2	O dano inicial da I/R intestinal é microcirculatório (círculo verde). Há produção de radicais livres, citocinas e aumento de permeabilidade vascular; atração e ativação de leucócitos, num fenômeno que se auto-estimula. No círculo amarelo vemos a extensão da lesão para o intestino, com morte celular e aumento da permeabilidade intestinal. Há translocação bacteriana e passagem de mediadores inflamatórios. O processo torna-se então sistêmico (círculo vermelho), com inflamação sistêmica (SIRS) e sepse. O comprometimento de órgãos distantes como rins, pulmões, fígado e coração, pode levar a sua falência e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS).....	7
Figura 3	Apresentação do delineamento experimental do trabalho demonstrando os três grupos estudados (Sham, Salina e Diazóxido), bem como os procedimentos realizados em cada um destes.....	21
Figura 4	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de IFABP sérico (pg/mL). Valor de p não significativo (ANOVA uma via).....	30
Figura 5	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de TNF sérico (pg/mL). Valor de p não significativo (ANOVA uma via).....	31
Figura 6	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de MCP-1 sérico (pg/mL). Valor de p não significativo (Kruskal Wallis).....	32

Figura 7	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de TNF α intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)..	33
Figura 8	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-10 Intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)..	34
Figura 9	Valores mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-6 intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p significativo (t não pareado).....	35
Figura 10	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de TNF α hepático (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)..	36
Figura 11	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-10 hepática (unidades arbitrárias). Valor de p < 0,05 (t não pareado).....	37
Figura 12	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-6 hepática (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (Mann Whitney).	38
Figura 13	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de COX-2 intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p < 0,05 (t não pareado).....	39
Figura 14	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de COX-2 hepática (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (Mann Whitney).	40
Figura 15	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de JAM-A intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)..	41
Figura 16	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de ocludina intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)..	42
Figura 17	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de ZO-1 intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p < 0,05 (t não pareado).....	43
Figura 18	Grau 0, correspondente a mucosa intestinal normal.....	44
Figura 19	Grau 2 em que é possível visualizar aumento dos espaços entre as vilosidades.....	44

Figura 20	Escore 3, com destruição da porção livre das vilosidades e dilatação de capilares.....	44
Figura 21	Grau 5, onde é possível inclusive visualizar a destruição da lâmina própria do epitélio.....	44
Figura 22	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da classificação histológica intestinal. Valor de $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis).....	45
Figura 23	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da classificação histológica hepática. Valor de p não significativo (Kruskal-Wallis).....	46
Figura 24	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da classificação histológica cardíaca. Valor de p não significativo (Kruskal-Wallis).....	47
Figura 25	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de AST sérico (mU/mL). Valor de p significativo para Diazóxido x Controle e Diazóxido x Sham. (Kruskal-Wallis, Dunn).....	48
Figura 26	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de ALT sérico (U/L). Valor de p não significativo (Kruskal Wallis).....	49
Figura 27	Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de troponina sérica (ng/mL). Valor de p significativo (ANOVA uma via; Tukey): Controle x Sham e Diazóxido x Sham.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis estudadas de acordo com o material coletado...	22
Tabela 2	Sequências de Primers utilizados neste estudo para realização da técnica de PCR em tempo real.....	26

RESUMO

Dourado SFM. *Avaliação do impacto do diazóxido nas lesões locais e sistêmicas em animais submetidos a isquemia e reperfusão intestinal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Isquemia e reperfusão (I/R) intestinal podem ocorrer em cirurgias vasculares e abdominais, trauma, choque, grandes queimados e transplante intestinal. O órgão funciona como barreira contra agressores externos, e uma vez lesionado, sofre aumento da permeabilidade, que permite a passagem de mediadores inflamatórios e bactérias, causando sepse, inflamação sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos, que é a maior causa de morte em unidades de terapia intensiva cirúrgica. O diazóxido tem mecanismo de ação semelhante ao pré-condicionamento isquêmico, e demonstrou proteção em I/R de diversos órgãos. De forma semelhante, em cenário de isquemia e reperfusão intestinal, supomos que ele desempenharia função protetora no intestino, através do pré-condicionamento farmacológico, e em órgãos distantes, exercendo o pré-condicionamento remoto. **OBJETIVOS:** Avaliar os efeitos do diazóxido em intestino, fígado e coração de ratos submetidos a uma hora de isquemia e doze horas de reperfusão intestinal. **MÉTODOS:** 32 ratos machos Wistar divididos em três grupos, Sham (n=6); Salina (n=13) submetido a uma hora de isquemia e doze horas de reperfusão intestinal, tendo recebido soro fisiológico; Diazóxido (n=13) submetido a I/R e diazóxido. O modelo de I/R incluiu laparotomia mediana e clampeamento da artéria mesentérica superior. No soro,

estudamos citocinas, AST, ALT, troponina e IFABP. Em amostras de intestino e fígado, quantificamos a expressão gênica de citocinas e COX-2. No intestino foi estudada ainda a expressão de proteínas ligadas a barreira intestinal (*tight junctions*): ZO-1, ocludina e JAM-A. Realizamos preparações histológicas em hematoxiina e eosina de intestino, fígado e coração. **RESULTADOS:** Evidenciamos redução de expressão de IL-6 intestinal, redução de IL-10 hepática, além de menor expressão de COX-2 intestinal e de ZO-1. IL-6 tem níveis associados a dano da barreira intestinal, assim como COX-2. A menor expressão de ZO-1 indica menor esforço de reparação, proporcional ao grau de lesão em modelos não letais de dano tecidual. **CONCLUSÃO:** O diazóxido exerce efeito protetor sobre o intestino de ratos após uma hora de isquemia e doze horas de reperfusão, porém não foi possível demonstrar efeito protetor sobre fígado ou coração.

Descritores: 1. traumatismo por reperfusão; 2. permeabilidade intestinal; 3. intestino delgado; 4. diazóxido; 5. junções íntimas; 6. ciclo-oxigenase 2; 7. insuficiência de múltiplos órgãos; 8. ratos wistar; 9. citocinas

ABSTRACT

Dourado SFM. *Evaluation of the impact of diazoxide in local and systemic lesions in animals submitted to intestinal ischemia and reperfusion* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

INTRODUCTION: Intestinal ischemia and reperfusion can occur in great vascular and abdominal surgeries, trauma, shock, great burns and intestinal transplantation. Since the organ works as a barrier against external threats, and once damaged, permeability increases, which permits passage of bacteria and inflammatory mediators, causing sepsis, systemic inflammation and multiple organ dysfunction, the greatest death cause in surgical intensive care units. Diazoxide has similar mechanisms to ischemic preconditioning, and proved benefit during I/R in several tissues. Similarly, in an intestinal ischemia-reperfusion situation, we suppose it can protect intestine with pharmacological preconditioning, and remote organs, with remote preconditioning. **OBJECTIVE:** To evaluate diazoxide effects over intestine, liver and heart of rats submitted to one-hour ischemia and twelve-hour reperfusion of intestine. **METHODS:** 32 male Wistar rats divided in three groups, Sham (n=6); Saline (n=13) submitted to one hour of intestinal ischemia and 12 hours of reperfusion and 0.9% saline; Diazoxide (n=13), submitted I/R and diazoxide. I/R model included median laparotomy and superior mesenteric artery clamping. In blood, we studied cytokines, TGO, TGP, troponin and IFABP. In intestine and liver, we quantified genic expression. Of cytokines and COX-2. In intestine, we also studied

expression of tight junctions proteins. Also, histologic analysis in hematoxylin-eosin for intestine, liver and heart. **RESULTS:** We found lower expression of intestinal IL-6, hepatic IL-10, and lower levels of intestinal COX-2 and ZO-1. IL-6 high levels are associated with intestinal barrier lesion, as for COX-2. Lower levels of ZO-1 correlate with minor repair effort, proportional to lesion grade in non-lethal models of damage. **CONCLUSION:** Diazoxide exerts protective effect over intestine of rats submitted to one hour of ischemia and twelve hours of intestinal reperfusion, but no effect was demonstrated over liver and heart.

Descriptors: 1. reperfusion injury; 2. intestinal permeability; 3. Intestine, small; 4. diazoxide; 5. tight junctions; 6. cyclooxygenase 2; 7. multiple organ failure; 8. rats, wistar; 9. cytokines

1. INTRODUÇÃO

1.1 A circulação intestinal e a isquemia

A circulação intestinal caracteriza-se como complacente e muito dinâmica. O volume sanguíneo intestinal pode variar de 20-25% do débito cardíaco no jejum, quando uma pequena parte dos capilares é perfundida, até 35% no período pós-prandial¹.

Quanto à demanda de oxigênio, o intestino possui consumo constante e independente da circulação, através de ampla variação na taxa de extração¹. No entanto, quando há fluxos inferiores a 30mL/min/100g ou pressão arterial média inferior a 50mmHg, a perfusão é acentuadamente reduzida e a captação de oxigênio se torna dependente do fluxo².

Por meio do ajuste do volume sanguíneo esplâncnico, o organismo o utiliza como um reservatório para situações de aumento de demanda em outros locais, quando o sangue é redirecionado através da vasoconstrição intestinal³.

A isquemia representa um desequilíbrio entre a oferta e demanda de oxigênio para um tecido, e fenômenos de isquemia e reperfusão (I/R) intestinal são comuns em indivíduos saudáveis. Como exemplo, durante o exercício físico, 80% do fluxo mesentérico é desviado para os órgãos vitais (coração, fígado e cérebro) e músculos⁴.

De forma análoga, quando o indivíduo sofre hipovolemia aguda ou em situações de vasodilatação sistêmica que levem à hipotensão arterial, o fluxo intestinal reduz-se de tal maneira que haverá isquemia⁴. A oxigenação das

vilosidades intestinais, através de mecanismo de contra-corrente, facilita que uma redução da circulação sanguínea resulte em I/R e estas sejam o primeiro local atingido⁵.

O mecanismo acima é descrito como não-oclusivo. No oclusivo, existe um obstáculo físico à perfusão intestinal no vaso, seja em seu interior, como um êmbolo vascular, ou externo a este, como uma compressão tumoral⁶.

A isquemia intestinal clinicamente manifesta é rara, porém com incidência crescente. Dados suecos indicam 12,9/100.000 pessoas-ano⁷, e indicadores americanos de 0,1 a 1 por cada mil admissões hospitalares².

Na prática médica, podemos encontrar isquemia intestinal aguda associada a grandes procedimentos cirúrgicos vasculares ou abdominais, trauma, choque hemorrágico, sepse⁸ e grandes queimados⁹. Cirurgias cardíacas estão associadas a quadros de isquemia intestinal não oclusiva em 0,16-9% das vezes¹⁰, e cirurgias de aorta em 1-10%¹¹. Durante o transplante de intestino, a isquemia se instala após a captação no doador, com reperfusão após implante do órgão no receptor¹². Além disso, pacientes com história de miocardiopatia dilatada, arritmias cardíacas, aterosclerose, pós-operatório recente, trombose venosa profunda, embolia arterial ou doenças do colágeno são populações sob risco de isquemia intestinal^{2,10}.

A entidade possui apresentação inespecífica, tratamentos escassos e rápida evolução¹⁰, com mortalidade de 60-80% nas primeiras 24 horas⁶. A sua correlação com a disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS) pode explicar o índice elevado de desfechos desfavoráveis, bem como o pouco avanço na sobrevida ao longo dos anos.

1.2 A função intestinal de barreira

Os epitélios e endotélios são fundamentais na compartimentalização do organismo, pois constituem barreiras com permeabilidades específicas para cada tecido e órgão, sob influência de elementos locais. O intestino controla o fluxo de bactérias, toxinas, antígenos, água, íons e solutos entre o interstício e o meio externo, através de muco, camada de enterócitos e *tight junctions* (TJ)¹³.

TJ são complexos de proteínas presentes na membrana e no citoplasma dos enterócitos hoje considerados os elementos mais importantes da barreira intestinal. Elas têm papel na regulação do fluxo de substâncias (função *gate*), dividem a membrana celular em apical e basolateral (função *fence*)¹⁴ e agem como sinalizadores de proliferação, polarização e diferenciação¹⁵.

Sua composição inclui proteínas integrais da membrana celular, que se dispõem como um emaranhado de cordões anastomosados localizados no espaço paracelular dos enterócitos¹⁶. Estes componentes estão ligados a outras proteínas citoplasmáticas presentes em uma estrutura intracelular em formato de placa, que é ancorada ao citoesqueleto¹³, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 - *Tight junctions* (TJ) e alguns dos seus componentes. Dentre os transmembrana, temos as claudinas (amarelo), ocludinas (laranja) e JAM-A (laranja com preto). Dentro da célula, elas interagem com um complexo de proteínas citoplasmático, a placa citoplasmática, em azul, que se conecta ao citoesqueleto, em preto. Participam ainda do complexo proteínas citoplasmáticas com função sinalizadora (amarelo), reguladores de transcrição em vermelho e proteínas adaptadoras como a ZO-1 (verde), que conectam os demais componentes entre si (verde). Adaptado de Buckley, 2017¹⁷.

O principal marcador das TJ, pela sua onipresença, são as ocludinas. Foram as primeiras proteínas transmembrana identificadas, em 1993, atualmente em sete isoformas¹⁸. Embora sua ausência não cause alteração morfológica nas TJ¹⁹, esta resulta em alteração na expressão e distribuição de outras proteínas, levando a aumento de permeabilidade²⁰. Elas também controlam a transmigração de neutrófilos e a extrusão de células apoptóticas, de forma que a sua deficiência genética esta associada a inflamação crônica e hiperplasia epitelial, com disfunção de diversos órgãos¹⁵. Finalmente,

participam na transdução de sinais de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa – TNF α e interferon gama – IFN γ ^{18,21}.

As claudinas são as proteínas transmembrana mais importantes, foram descritas em 1998¹⁸, e se expressam em diferentes isoformas a depender do tecido²¹. Elas têm função de estreitar os espaços intercelulares e constituem poros iônicos destinados ao transporte paracelular de substâncias, o que as torna responsáveis pela seletividade do transporte através das TJ. Sua ausência causa aumento da permeabilidade e resposta inflamatória¹⁴.

A *junction-associated molecule A* – JAM-A está ligada à sinalização de inflamação, angiogênese e aterosclerose, e sua deficiência é associada a aumento da permeabilidade, infiltrado de neutrófilos e agregados linfóides¹⁵.

Zonula occludens-1 (ZO-1), identificada em 1986, é uma proteína citoplasmática que une elementos da membrana à actina do citoesqueleto¹⁷, e sua importância ressalta-se no fato de que sua ausência leva a óbito ainda na fase de embrião²².

O controle dinâmico do fluxo de substâncias através do espaço paracelular é feito através de permeabilidade seletiva e variável em função de diversos estímulos, como dieta, sinalização humoral ou neuronal, proteases, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e estímulos microbianos²³.

Defeitos de barreira intercelular têm correlação com diversas doenças locais e sistêmicas, de caráter inflamatório, autoimune ou funcional, como doença inflamatória intestinal, doença celíaca, síndrome do intestino irritável, diabetes tipo 1 e esclerose múltipla²³.

Os neutrófilos, por exemplo, podem alterar fisicamente o espaço paracelular após sua migração através deste ou liberarem sinalizadores que

causam afrouxamento das TJ. A produção de proteases, também por macrófagos e mastócitos, pode destruir as TJ²⁴.

O conceito de falência intestinal (*gut failure*) inclui a situação em que há considerável morte de enterócitos e/ou perda da sua função, associada ou não ao dano da barreira intestinal. Embora ocorra de forma clinicamente frequente, esta é uma condição normalmente subestimada e subdiagnosticada²⁵.

Recentemente, modelos animais têm sido usados amplamente para demonstrar associação entre injúria intestinal e lesão de barreira: choque hemorrágico e sepse demonstraram que a hipoperfusão esplâncnica gera isquemia e injúria histológica com aumento da permeabilidade²⁶ endotelial e epitelial³. A primeira causa extravasamento de moléculas plasmáticas de alto peso e edema intersticial e a segunda permite a passagem de microrganismos e endotoxinas da luz intestinal para o interior do organismo, além de mediadores inflamatórios. O resultado é sepse e resposta inflamatória sistêmica².

1.3 Fisiopatologia da I/R e sua amplificação

Em se tratando da I/R intestinal, há uma agressão, inicialmente restrita a uma porção do órgão, que pode sofrer amplificação a ponto de atingir níveis sistêmicos de inflamação e dano tecidual² (Figura 2).

A isquemia reduz aguda e severamente a oferta de oxigênio, com substituição do metabolismo aeróbico pela via anaeróbica. Como não há a degradação completa da glicose, tem-se menor eficiência na produção de energia e acúmulo de metabólitos²⁷.

A anaerobiose inclui a transformação da enzima xantina desidrogenase (XD), envolvida na transferência de um elétron para o difosfato de adenina (ADP) e consequente transformação em trifosfato (ATP), em xantina oxidase (XO). XO transfere esses elétrons para o oxigênio e gera radicais livres, moléculas altamente reativas por possuírem elétrons não pareados. Os níveis produzidos nesse momento são baixos devido à escassez do oxigênio, o que permite que a enzima superóxido-dismutase (SOD – anti-radicais livres) seja inibida sem maiores danos²⁸.

Figura 2 - O dano inicial da I/R intestinal é microcirculatório (círculo verde). Há produção de radicais livres, citocinas e aumento de permeabilidade vascular; atração e ativação de leucócitos, num fenômeno que se auto-estimula. No círculo amarelo vemos a extensão da lesão para o intestino, com morte celular e aumento da permeabilidade intestinal. Há translocação bacteriana e passagem de mediadores inflamatórios. O processo torna-se então sistêmico (círculo vermelho), com inflamação sistêmica (SIRS) e sepse. O comprometimento de órgãos distantes como rins, pulmões, fígado e coração, pode levar a sua falência e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS). Adaptado de Vollmar, 2011².

A escassez de energia leva à disfunção da bomba de sódio e potássio, com aumento da entrada de sódio, água e cálcio, e consequente edema e ruptura celular, associados a ativação de reguladores de transcrição⁸.

O fenômeno que permitiria a interrupção desse processo e a regeneração tecidual é a reperfusão. Esta, no entanto, gera dano adicional, conforme demonstrado em um estudo de 1986 em que três horas de isquemia e uma hora de reperfusão no intestino delgado resultaram em dano tecidual histológico superior a quatro horas de isquemia²⁹.

A injúria da reperfusão surge inicialmente na microcirculação. Uma vez reestabelecido o fluxo sanguíneo, a perfusão tecidual pode não ser eficazmente restaurada, em decorrência de obstrução parcial mecânica dos vasos secundária a redução da velocidade do fluxo e/ou estreitamento capilar causados por hemoconcentração, trombose, edema endotelial, disfunção vasomotora² e principalmente pela adesão leucocitária ao endotélio, resultante de ativação celular e de integrinas e selectinas (proteínas de adesão)²⁷. Esse mecanismo é descrito como **no-reflow**⁸.

O retorno da circulação e oxigênio em grandes quantidades encontra ambiente favorável para formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são radicais livres, a partir da XO, conforme descrito. Outras fontes de radicais livres na reperfusão incluem hemoglobina e mioglobina, que formam espécies reativas de ferro e complexos enzimáticos de membrana²⁸. O fenômeno de geração maciça de radicais livres, ativação inflamatória e agressão tecidual é descrito como **reflow-paradox**², que caracteriza o efeito paradoxal de lesão resultante de uma intervenção que deveria ser benéfica à primeira vista.

Os radicais livres causam dano direto através da peroxidação das membranas e desnaturação das proteínas enzimáticas intracelulares, o que resulta em destruição de organelas, necrose e quimiotaxia de neutrófilos. Há

oxidação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear- κ B, que leva a transcrição de citocinas inflamatórias e mecanismos de morte celular programada⁸.

A resposta ao estresse orgânico se caracteriza por liberação maciça de citocinas, com dano endotelial e aumento de permeabilidade. Esses mediadores parecem influenciar a remodelação das TJ, introduzindo e retirando componentes protéicos ou a reestruturação das redes de proteínas, dentre elas a própria actina³⁰.

TNF α e IFN γ aumentam a permeabilidade através da abertura dos espaços paracelulares, pela contração dos microfilamentos de miosina e pela internalização de proteínas das TJ¹⁶. O primeiro também promove apoptose epitelial e o segundo inibe a bomba de sódio e potássio, causando edema celular²⁴. Ambos ativam fator nuclear- κ B, funcionando como retroalimentação positiva.

Interleucina 6 (IL-6) pode ser produzida por estímulo de fatores como o TNF α ³¹. Estudos a associam com a disfunção da barreira intestinal³², através do aumento da permeabilidade paracelular a cátions através do recrutamento de claudinas formadoras de poros³³, e é necessária para a lesão da barreira em modelo de choque hemorrágico³⁴.

IL-10 tem papel anti-inflamatório e sua ausência em animais geneticamente modificados causa elevação intestinal de TNF α , IL-1 e IL-6. Estudos têm mostrado efeito protetor na barreira intestinal³³.

Radicais livres também estimulam a enzima fosfolipase A-2 a produzir o ácido araquidônico, precursor de eicosanoides (tromboxano A-2 e leucotrienos), cuja fisiopatologia se encontra intimamente ligada às enzimas

ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e a produção de prostanóides³⁵. Baixos níveis destes, associados a função constitutiva de COX-1 e a expressão basal de COX-2 estão associados fisiologicamente ao transporte de íons, secreção intestinal de bicarbonato, migração celular, supressão de citocinas e manutenção do tônus muscular liso e da perfusão da mucosa, sendo, portanto, fundamentais na homeostase e adequado funcionamento da barreira intestinal³⁶. Estudos demonstraram que essa inibição da secreção basal se associa a ulceração gástrica e colônica³⁷.

A COX-2 tem a sua atividade altamente induzida durante a resposta inflamatória e produz um excesso de prostaglandina E₂ (PGE₂), que causa alteração na distribuição das proteínas das TJ, aumento da permeabilidade intestinal³⁸ e falência da barreira³⁹. Tal fato é atenuado após administração de inibidor da COX-2 celecoxibe³⁶ ou na própria deficiência da enzima⁴⁰. De forma semelhante, trabalhos envolvendo doença inflamatória intestinal e enterocolite necrosante enfatizam o fato de a expressão aumentada de COX-2 ser um fator muito importante na falência da barreira intestinal³⁶.

Todo a cadeia descrita leva à atração e à migração de neutrófilos circulantes, que liberam grânulos contendo proteases e elastases, com destruição da matriz extracelular e apoptose epitelial; geração adicional de citocinas e EROS; aumento de permeabilidade, edema e trombose⁸.

1.4 Translocação bacteriana e passagem de mediadores inflamatórios

Embora descrito desde o século XIX, o conceito de translocação bacteriana surgiu na década de 1980⁴¹ e representa a passagem de bactérias residentes do trato gastrointestinal viáveis ou seus antígenos e toxinas⁴² através

da barreira intestinal, o que pode permitir acesso à circulação sistêmica e a tecidos originalmente estéreis, como os linfonodos mesentéricos⁴³.

A mucosa do intestino delgado tem 300 metros quadrados de superfície, 10^{12} micro-organismos para cada mililitro de fezes em sua porção terminal, de 500 a mil espécies distintas²⁵. Longe de ser um fenômeno exclusivamente patológico, a translocação tem uma taxa basal de ocorrência em humanos de 5-10%, e em animais de 10-20%, e desempenha papel importante na tolerância imunológica⁴³.

Tal frequência aumenta em situações de hiperproliferação ou alteração da flora intestinal, como imunossupressão, icterícia, obstrução intestinal, doença inflamatória intestinal, doença maligna, nutrição parenteral e cirurgias de urgência⁴⁴. Além disso, em situações de estresse em que há aumento da permeabilidade intestinal, como na I/R intestinal, o órgão se torna vulnerável a uma invasão bacteriana maciça e passagem de mediadores inflamatórios para a circulação sistêmica³⁰.

No modelo de três agressões (*“three-hit”*) que visa explicar a SIRS e a DMOS, a agressão inicial seria a hipoperfusão ou isquemia intestinal, funcionando como estímulo inicial (*“primer”*) ao ativar localmente o sistema imunológico. A segunda agressão seria o dano causado pela reperfusão, com amplificação do dano, e a terceira injúria seria a perda da barreira intestinal, que permitiria a translocação⁴⁵.

Corroborando a associação entre translocação e sepse, estudos animais e humanos correlacionaram bactérias presentes no lúmen intestinal com culturas de linfonodos positivas em linfonodos mesentéricos colhidos através de laparotomia⁴⁶ e infecções a distância²⁶.

No entanto, em pacientes de UTI não submetidos à laparotomia, a ligação entre translocação e SIRS é indireta e baseada em aumento da permeabilidade intestinal identificada através de marcadores administrados por via enteral⁴⁶, não tendo sido evidenciada correlação entre endotoxemia, culturas de sangue positivas e complicações infecciosas nessa população⁴⁷.

Existe clara dificuldade em estudar translocação em pacientes humanos não operados, porém as bactérias como fator isolado parecem não explicar a SIRS.

De forma semelhante, em estudo envolvendo 241 ratos submetidos a I/R intestinal não foram identificados casos de endotoxemia em até 24 horas de reperfusão⁴⁸. Em paralelo, os trabalhos que buscavam a redução da população bacteriana no intestino reduziam o índice de complicações infecciosas, sem alteração na mortalidade⁴⁶.

O intestino é o órgão com maior concentração de tecido linfóide do corpo⁴¹, e a associação entre hipoperfusão esplâncnica, disfunção da barreira intestinal, resposta inflamatória e SIRS⁴⁵ aponta no sentido de que essa disseminação sistêmica e suas consequências clínicas podem ter sua origem ligada à inflamação^{30,49}.

A teoria “*gut-lymph*”, de 2006, descreve que após a lesão da barreira intestinal, bactérias e endotoxinas atingiriam a lâmina própria e ativariam macrófagos e outras células imunes produtoras de citocinas, disseminando-as através da linfa⁴¹. Dessa forma, hipoperfusão causa I/R, com perda de barreira e disseminação de fatores inflamatórios sem a necessidade da translocação para linfonodos ou além⁴⁵. Esta participaria ao iniciar, perpetuar ou mesmo exacerbar uma SIRS.

Entende-se, dessa forma, que o aumento da permeabilidade intestinal está intimamente relacionado a SIRS e DMOS, tanto através da passagem de microorganismos e partículas derivadas como de mediadores inflamatórios, sendo parte importante de fisiopatologia da amplificação sistêmica da lesão intestinal.

1.5 Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS)

É amplamente aceito que a DMOS resulta de uma SIRS ou de um processo séptico e, uma vez que o intestino funciona como um grande órgão imunológico e reservatório de microorganismos, autores o intitularam o motor da DMOS⁵⁰.

A DMOS ganhou destaque na década de 1970, quando os avanços em terapia intensiva como ventilação mecânica, hemodiálise e nutrição parenteral total permitiram a sobrevivência após a falência de um único órgão. O uso de protocolos como o *Surviving Sepsis Campaign* trouxe mudanças epidemiológicas na DMOS e resultou no aumento de casos relacionados a SIRS e sem processo infeccioso identificável (sepse)⁵¹.

Hoje, a DMOS representa uma síndrome com características epidêmicas em UTI e é a causa mais prevalente de morte em unidades cirúrgicas em todo o mundo⁴², respondendo por 50-80% dos óbitos⁹. Grande parte se deve ao fato de o tratamento ser restrito a medidas de suporte clínico.

1.6 O pré-condicionamento isquêmico

Vários autores têm buscado formas de atenuar as lesões decorrentes da I/R. Dentre elas, o pré-condicionamento isquêmico é a estratégia mais efetiva desde seu primeiro relato em 1986.

Essa condição ocorre quando um tecido submetido à isquemia prolongada recebe períodos breves de reperfusão e isquemia imediatamente antes da reperfusão definitiva. Ela é eficaz em todas as células e pode levar a até 75% de redução de dano. Embora seu mecanismo seja pouco compreendido, sabe-se que está associado aos canais de potássio ATP dependentes (K_{ATP}) mitocondriais, uma vez que o uso de antagonistas destes anula a proteção⁵².

Tais canais estão amplamente distribuídos no corpo, inclusive nas mitocôndrias e se abrem após redução do ATP citosólico⁵³. Sua regulação se dá por fatores intra e extracelulares, dentre eles a concentração de ADP e a ação de proteína-quinases, possíveis mecanismos dos estímulos de condicionamento⁵⁴.

A abertura dos K_{ATP} permite influxo de potássio, hiperpolarização da membrana e inibição da entrada de cálcio, importante mensageiro de morte celular (pela dificuldade em ativar seus canais a partir de variação de voltagem)⁵². Nos subtipos mitocondriais, induzem menor consumo de ATP, alcalinização da matriz mitocondrial e fechamento do poro de transição de permeabilidade de membrana, cuja abertura desencadeia depleção de ATP e falência energética da célula⁵⁵.

O pré-condicionamento num determinado órgão pode, ainda, desencadear proteção contra I/R em outros órgãos distantes, fenômeno conhecido como pré-condicionamento isquêmico remoto⁵⁶.

1.7 Pré-condicionamento farmacológico e diazóxido

Estudos demonstraram que determinadas intervenções farmacológicas tiveram efeito semelhante ao do pré-condicionamento isquêmico: o pré-condicionamento farmacológico.

O uso clínico do Diazóxido data da década de 1960, inicialmente como vasodilatador direto, hipotensor e hiperglicemiante em casos de hipoglicemia intratável. A droga tem ação não-seletiva e não-específica e seu mecanismo principal ocorre pela abertura de canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), inclusive os mitocondriais livres⁵⁷.

Na década de 1990, surgiram estudos demonstrando potente efeito cardioprotetor, *in vitro* e *in vivo*, em diversos animais (ratos, coelhos, cães) e em humanos, que mimetiza o pré-condicionamento isquêmico para o coração na faixa de 1-10mg/kg endovenoso⁵⁴.

Estudo em miocárdio humano *in vitro* demonstrou que diazóxido protegeu contra I/R⁵⁸, e estudo *in vivo* em 40 pacientes utilizou diazóxido em solução de cardioplegia e demonstrou proteção miocárdica durante revascularização cardíaca⁵⁹.

Após I/R cerebral global em ratos, o diazóxido reduziu o edema cortical e a permeabilidade da barreira hemato-encefálica⁶⁰. Ainda em ratos, o pós-condicionamento com diazóxido reduziu o estresse oxidativo após I/R de

músculo esquelético⁶¹, e protegeu as ilhotas pancreáticas⁶² e o pulmão⁶³ após isquemia fria.

Com relação a I/R espinhal em coelhos, a droga promoveu melhora da função neurológica, redução dos níveis de EROS, dano oxidativo ao DNA, apoptose celular e preservou a estrutura mitocondrial⁶⁴.

A I/R intestinal tem diagnóstico e tratamento difíceis, o que motiva a estudar formas de atenuá-la. Formulamos a hipótese de que o diazóxido poderia ter efeito protetor contra a I/R intestinal, inclusive com menor dano a órgãos à distância. A importância de agir nesse estado patológico seria a redução da incidência endêmica da DMOS e, assim, evitar sua alta mortalidade.

2. OBJETIVOS

1. Identificar a ocorrência de lesão em intestino, fígado e coração decorrentes da I/R intestinal num modelo experimental em ratos;
2. Avaliar possível efeito protetor do diazóxido na forma de pré-condicionamento farmacológico sobre a lesão intestinal após I/R do próprio órgão;
3. Estudar possível efeito protetor do diazóxido sobre a lesão a distância em fígado decorrente de I/R intestinal;
4. Avaliar o impacto do uso do diazóxido no coração de ratos submetidos a I/R intestinal

3. MÉTODOS

Conduzimos os procedimentos no Laboratório de Investigação Médica –LIM 51– da Disciplina de Emergências Clínicas do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob o protocolo 083/15 (Anexo A). Seguimos os princípios de *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences and National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., 1996.*

3.2 Animais de experimentação

Participaram do projeto 32 *Rattus albinus* machos da linhagem Wistar, do tipo *specific-pathogen-free* (SPF)⁶⁵ e com peso entre 250 e 350 gramas, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da USP.

Uma vez recebidos no LIM 51, foram mantidos em gaiolas de até 4 animais, condições controladas de temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), períodos de 12:12h de luz, livre acesso a água filtrada e alimentados com Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA).

3.3 Cirurgia e indução de I/R intestinal

Utilizamos um modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal

já amplamente estudado e com o qual nossa equipe tem experiência.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina a 5% (Ketalar®, Parke-Davis) na dose de 105 mg/kg e cloridrato de xilazina a 2% (Rompum®, Bayer) 20 mg/kg. Eram feitas doses adicionais a cada trinta minutos ou conforme necessário, com base em observação clínica e frequência respiratória.

Os ratos foram mantidos em ventilação espontânea, aquecidos por lâmpada halógena de 45W e 127V e aferição de temperatura através de termômetro retal digital (YSI Precision 4000A Thermometer, USA) entre 35-37°C.

A seguir, procedia-se a laparotomia mediana de 3 centímetros a partir do apêndice xifóide, dissecação romba, identificação e isolamento da artéria mesentérica superior (AMS) em sua origem a partir da artéria aorta e seu pinçamento com clipe microvascular atraumático durante 60 minutos. A isquemia era confirmada através do empalidecimento, ausência de pulsações arteriais da arcada mesentérica e cessação do enchimento de ramos vasculares do intestino.

Para prevenção de desidratação, fechávamos temporariamente a incisão com fio mononylon 4.0. Decorridos 55 minutos, esta era aberta e um novo exame das alças intestinais comprovava a persistência de isquemia completa, através de palidez, atonia e edema. Após mais cinco minutos, totalizando 60 minutos de isquemia, procedia-se à retirada do clampe e à reperfusão intestinal, com a percepção de hiperemia e reaparecimento das pulsações arteriais das arcadas vasculares. Fechávamos a incisão e os

animais eram colocados em gaiolas individuais para recuperação anestésica, sob observação rigorosa, dando início ao período de reperfusão.

Com base no interesse em estudar possíveis lesões de órgãos à distância associados a aumento de permeabilidade e translocação bacteriana, que demandam tempo para que ocorram, optamos por um período de reperfusão de 12 horas. Nesse intervalo, eram mantidas as condições ambientais e de cuidados descritos, e os animais receberam medicação analgésica adicionada à água (10 gotas de dipirona para cada 60mL).

3.4 Delineamento experimental

Distribuímos os animais por meio de envelopes selados em três grupos: Sham, Salina e Diazóxido. Os animais dos dois últimos grupos foram submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão intestinal.

Grupo Sham (n=6): anestesiados, submetidos a laparotomia e dissecação da artéria mesentérica superior (AMS), porém sem o seu clampeamento. Após 60 minutos, a incisão era fechada e os animais colocados em gaiola por 12 horas. Recebiam então uma segunda anestesia para eutanásia e coleta de amostras.

Grupo Salina (n=13): receberam anestesia, tratamento com soro fisiológico e 15 minutos após foram submetidos a laparotomia com clampeamento da AMS e isquemia por 60 minutos. Após 12 horas de reperfusão, tiveram amostras coletadas.

Grupo Diazóxido (n=13): receberam anestesia, tratamento com diazóxido e 15 minutos após foram submetidos a laparotomia com clampeamento da AMS por 60 minutos. Suas amostras foram coletadas após 12 horas de reperfusão.

Figura 3 - Apresentação do delineamento experimental do trabalho demonstrando os três grupos estudados (Sham, Salina e Diazóxido), bem como os procedimentos realizados em cada um destes

3.5 Administração do diazóxido

O medicamento diazóxido (D9035, Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri) foi administrado através da veia peniana na dose de 3,5mg/kg, semelhante a outros estudos publicados⁵⁴. Foi utilizada uma tabela a fim de que animais dos grupos Salina e Diazóxido recebessem o mesmo volume de soro fisiológico ou solução de diazóxido ajustado pelo peso corporal.

3.6 Coleta de materiais para análise

Findo o período de reperfusão, os animais eram novamente anestesiados e submetidos a eutanásia. Seguia-se a coleta de 5mL de sangue

da veia cava inferior em seringa com heparina, sua centrifugação imediata para separação do plasma (*Centrifuge 5804 R®*, *Eppendorf, Hamburg, Germany*) e armazenamento em freezer a -80°C .

Fragmentos de coração, fígado (lobos caudado e esquerdo) e íleo terminal (5 centímetros da valva ileocecal) eram lavados em solução salina e preparados para análise laboratorial e estudo histológico. As primeiras eram armazenadas em freezer a -80°C aguardando processamento ao término de todo o experimento, e as amostras destinadas a patologia seguiram para processamento adequado.

No soro, analisamos citocinas e marcadores de lesão nos órgãos: troponina, IFABP, AST e ALT. Os tecidos foram estudados através de histologia, marcadores inflamatórios teciduais (hepáticas e intestinais), além de proteínas integrantes das TJ intestinais (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis estudadas de acordo com o material coletado

Soro	Intestino	Fígado	Coração
Citocinas IFABP	Citocinas Histologia	Citocinas Histologia	Histologia
AST ALT	COX-2 Proteínas de TJ	COX-2	

3.7 Marcadores de lesão no soro

Tendo em vista nosso objetivo de estudar lesões em intestino, fígado e coração optamos pela análise de marcadores séricos de lesão para cada um. Assim, estudamos proteína intestinal ligante de ácidos graxos –*intestinal fatty*

acid binding protein – IFABP (Mybiosource®) para o intestino; aspartato aminotransferase – AST, kit Biovision® e alanina aminotransferase – ALT, kit Mybiosource® para o fígado; e troponina – kit (Mybiosource®) para o coração.

Empregamos kits utilizando o método de *Elisa – enzyme-linked immunosorbent assay*. Esta técnica utiliza uma placa cujos poços são revestidos com anticorpo monoclonal para cada uma das variáveis testadas. Uma vez em contato com a amostra, ocorre a ligação entre anticorpo e seu antígeno, e após sucessivas lavagens para remover todo o material não ligado é adicionada uma enzima marcada com ligação específica para o referido anticorpo. Uma vez ligada a este, e após novas lavagens, resta nos poços apenas o complexo anticorpo-antígeno-enzima. A placa é incubada com solução de substrato para a enzima, sendo adicionado em seguida um reagente de parada. A intensidade da cor da reação enzimática é finalmente lida em leitor de microplacas, e a absorbância obtida é correspondente à concentração da variável presente na amostra.

Os resultados foram expressos em pg/mL, mU/mL, U/L e ng/mL, respectivamente.

3.8 Perfil inflamatório no soro por Milliplex

Através de kit Miliplex, realizamos a dosagem sérica de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 e MCP-1, por meio da tecnologia Luminex® xMAP®, da EMD Millipore (Merck Millipore Co., Alemanha), que cora internamente microesferas de poliestireno (beads) com dois corantes fluorescentes (incubação de 16 horas a 4°C sob agitação). Através de concentrações

precisas, podem ser criados 100 conjuntos coloridos distintos de esferas, sendo cada um deles revestido com um anticorpo de captura específico.

Após o analito de uma amostra ser capturado pelas esferas, ocorre ligação do anticorpo biotinilado durante incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A reação de mistura é, em seguida, incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina (molécula *reporter* que emite um sinal fluorescente), para completar a reação na superfície de cada microesfera. As microesferas passam rapidamente através de um laser que excita os corantes internos, marcando um conjunto de microesferas. Um segundo laser excita o corante fluorescente, na molécula *reporter*.

Finalmente, processadores digitais de sinais de alta velocidade identificam cada microesfera individualmente (o código de cor específico para ensaio) e os resultados do bio-ensaio baseados em sinais *reporter* fluorescentes podem ser assim quantificados. A leitura da reação foi feita em leitor de microplacas com software de análise específico para este tipo de leitura, o Luminex 100/200™ System (Luminex, Texas, EUA).

Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.9 Marcadores inflamatórios nos tecidos e proteínas das TJ intestinais por expressão gênica

Utilizamos fragmentos de íleo terminal para avaliação da expressão gênica de TNF- α , IL-10 e IL-6, JAM-A, ZO-1, ocludina e COX-2. No fígado

avaliamos a expressão de TNF- α , IL-10 e IL-6 pelo método de reação em cadeia da polimerase – PCR em tempo real.

Após a pulverização das amostras em nitrogênio líquido, a extração do RNA total é realizada utilizando o reagente Trizol®. Após adição de clorofórmio, o RNA é precipitado com isopropanol gelado, seguido de lavagem com etanol 70% gelado. O RNA obtido é diluído em água livre de RNase e tratado com DNase I (Invitrogen®).

A seguir, através da medida da densidade óptica em 260-280nm (Nano Vue Plus – spectrophotometer GE, New Jersey, USA) realizamos a quantificação, verificamos o índice de pureza do RNA pela relação 260/280 nm e eletroforese utilizando gel agarose 1% com bromido de etídio.

As misturas para qRT-PCR são preparadas usando-se kits Superscript Platinum III com SYBR Green incorporado (Invitrogen, #11736-051). A produção e amplificação do DNA é realizada em equipamento de PCR em tempo real Step One Term Cyclor (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). Os produtos são confirmados por tamanho usando gel em agarose 1,5%. A expressão relativa é calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁶⁶, usando o gene β -2 microglobulina ($\beta 2M$) para normalização, com as sequências de primer utilizadas na Tabela 2.

As condições de ciclagem da PCR são: 50°C por 30 minutos para transcrição reversa seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. As expressões gênicas estudadas foram expressas em unidades arbitrárias⁶⁷.

Tabela 2 - Sequências de Primers utilizados neste estudo para realização da técnica de PCR em tempo real

Gene	Sense	Reverse
IL-10	GAATTCCCTGGGAGAGAAGC	CGGGTGGTTCAATTTTTCAT
TNF-α	ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA	CGAGCAGGAATGAGAAGAG G
COX-2	AAAGCCTCGTCCAGATGCTA	ATGGTGGCTGTCTTGGTAGG
JAM-A	CGGTTCCCCTCCTTCTGAAT	CTGTCCCATAACCGTTCTGT
ZO-1	ATGACAAACAGCCCTACCCA	GGAGAGTAGAGGTTTCGAGG C
Ocludin a	TCCAACGGCAAAGTGAATGG	ACCTGTCGTGTAGTCGGTTT
Beta 2 M C	CGTGATCTTTCTGGTGCTTTGT	TTCTGAATGGCAAGCACGAC

3.10 Histologia de intestino, fígado e coração

Após fixação em solução de formol salino a 10%, os tecidos eram incluídos em parafina e procediam-se cortes de 5 micrometros, com a confecção de lâminas coradas por hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por patologista experiente e único, sem conhecimento da alocação dos grupos.

O estudo do íleo terminal foi realizado segundo os critérios do escore de Park-Chiu⁶⁸:

- Grau 0: mucosa sem alterações.
- Grau 1: vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou processo inflamatório, porém, com formação do espaço subepitelial de Grunhagen, em especial nas extremidades das vilosidades.
- Grau 2: presença de lise celular, formação do espaço subepitelial de Grunhagen e espaçamento aumentado entre as vilosidades.
- Grau 3: destruição da porção livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e de células inflamatórias.
- Grau 4: destruição estrutural das vilosidades, havendo apenas esboço de algumas delas, presença de células inflamatórias e material necrótico, áreas hemorrágicas e com perda de todo o epitélio das vilosidades e criptas.
- Grau 5: destruição de toda a mucosa, não se observando mais qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado na região da submucosa.
- Grau 6: Aumento da extensão da lesão, com a extensão dos graus anteriores e atingindo o nível das criptas.
- Grau 7: Presença de infarto transmucosa.
- Grau 8: Surgimento de infarto transmural.

Para o tecido hepático utilizamos o escore abaixo⁶⁹:

- 0- Normal
- 1- Vacuolização e picnose focal
- 2- Picnose extensa, hipereosinofilia citoplasmática, perda de borda intercelular
- 3- Necrose severa, hemorragia, infiltrado de neutrófilos, desintegração de cordões de hepatócitos.

As amostras de coração foram analisadas segundo o escore²²:

- 0-** Ausência de lesão
- 1-** Lesão mínima (contração de bandas e picnose dispersa)
- 2-** Lesão leve (contração de bandas, picnose e cariorrexe).
- 3-** Lesão moderada (anteriores, mais hipereosinofilia).
- 4-** Lesão moderada-intensa (anteriores, mais vacuolização).
- 5-** Lesão intensa (todos os anteriores, com edema ou inflamação).

3.11 Análise estatística

O número de animais em cada grupo foi determinado com base em trabalhos já publicados.

A análise descritiva foi realizada através de gráficos, utilizando mediana, intervalo interquartis e valores máximos e mínimos para as variáveis. Valores identificados como fora do intervalo de confiança de 95% foram excluídos.

Utilizamos o programa para Windows GraphPad Prism®, e valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados com significância estatística.

Nossos resultados foram estudados por métodos paramétricos e não

paramétricos, após avaliação da distribuição através de teste de normalidade. Para as análises em que comparamos três grupos, foi verificada também a homogeneidade das variâncias.

Para comparações entre dois grupos, foi realizado o teste t não pareado para distribuições normais⁷⁰, e para as distribuições fora da normalidade foi utilizado o teste de Mann-Whitney⁷¹.

Para comparações entre três grupos, comprovadas a distribuição normal e a homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste paramétrico para análise de múltiplos grupos – ANOVA (análise de variância) de uma via⁷². Nos casos em que houve diferença significativa entre os grupos utilizamos o teste de Tukey para comparação dois a dois. No caso de uma das condições iniciais não ser satisfeita, utilizamos o teste Kruskal Wallis (ANOVA on Ranks)⁷³. A presença de diferença significativa foi novamente estudada através do segundo teste – Dunn, em que comparamos os grupos dois a dois.

Com relação aos resultados da técnica de PCR, os mesmos foram normalizados em relação ao Grupo Sham e expressos em unidades arbitrárias que representam a expressão gênica nos grupos submetidos a I/R relativa ao grupo Sham. Partindo daí, Controle e Diazóxido foram avaliados através de teste t não pareado ou teste de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1 Marcador de lesão intestinal no soro - IFABP

Não foi encontrada diferença entre os níveis séricos de IFABP entre os grupos (Figura 4, Anexo B).

Figura 4 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de IFABP sérico (pg/mL). Valor de p não significativo (ANOVA uma via)

4.2 Dosagem sérica de citocinas

Dentre as citocinas séricas estudadas, não obtivemos mensuração de valores para IL-1 Beta, INF-gama, IL-2, IL-6 e IL-10. Apresentamos a seguir os dados referentes a TNF α e MCP-1.

4.2.1 TNF α sérica

Não foi encontrada diferença entre os níveis séricos de TNF-alfa entre os grupos (Figura 5, Anexo C).

Figura 5 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de TNF sérico (pg/mL). Valor de p não significativo (ANOVA uma via)

4.3 MCP-1 sérica

Não foi encontrada diferença entre os níveis de MCP-1 nos grupos estudados (Figura 6, Anexo D).

Figura 6 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de MCP-1 sérico (pg/mL). Valor de p não significativo (Kruskal Wallis)

4.4 Expressão de citocinas intestinais

4.4.1 Expressão relativa de TNF α intestinal

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de TNF α intestinal nos grupos estudados (Figura 7 anexo E).

Figura 7 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de TNF α intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)

4.4.2 Expressão relativa de IL-10 intestinal

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de IL-10 intestinal nos grupos estudados (Figura 8, Anexo F).

Figura 8 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-10 Intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)

4.4.3 Expressão relativa de IL-6 intestinal

Foi encontrada menor expressão de IL-6 intestinal no grupo Diazóxido comparado ao grupo Salina (Figura 9, Anexo G).

Figura 9 - Valores mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-6 intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p significativo (t não pareado)

4.5 Expressão de citocinas hepáticas

4.5.1 Expressão relativa de TNF α hepático

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de TNF- α hepático nos grupos estudados (Figura 10, anexo H).

Figura 10 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de TNF α hepático (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)

4.5.2 Expressão relativa de IL-10 hepática

Houve redução significativa da expressão gênica de IL-10 hepática no grupo Diazóxido em comparação com o grupo Controle. (Figura 11, Anexo I).

Figura 11 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-10 hepática (unidades arbitrárias). Valor de $p < 0,05$ (t não pareado)

4.5.3 Expressão relativa de IL-6 hepática

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de IL-6 hepática nos grupos estudados (Figura 12, Anexo J).

Figura 12 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de IL-6 hepática (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (Mann Whitney)

4.6 Expressão relativa de COX-2

4.6.1 COX intestinal

Houve redução significativa da expressão relativa de COX-2 intestinal no grupo Diazóxido comparado ao Grupo Controle (Figura 13, Anexo K).

Figura 13 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de COX-2 intestinal (unidades arbitrárias). Valor de $p < 0,05$ (t não pareado)

4.6.2 COX-2 hepática

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de COX-2 hepática nos grupos estudados (Figura 14, anexo L).

Figura 14 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de COX-2 hepática (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (Mann Whitney)

4.7 Expressão relativa de moléculas das TJ intestinais

4.7.1 JAM-A

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de JAM-A nos grupos estudados (Figura 15, Anexo M).

Figura 15 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de JAM-A intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)

4.7.2 Ocludina

Não foi encontrada diferença entre a expressão relativa de ocludina intestinal nos grupos estudados (Figura 16, Anexo N).

Figura 16 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de ocludina intestinal (unidades arbitrárias). Valor de p não significativo (t não pareado)

4.7.3 ZO-1

Houve redução significativa da expressão relativa de ZO-1 no grupo Diazóxido comparado a Controle. (Figura 17, Anexo O).

Figura 17 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da expressão relativa de ZO-1 intestinal (unidades arbitrárias). Valor de $p < 0,05$ (t não pareado)

4.8 Análise histológica

4.8.1 Histologia intestinal

As figuras representam diversos graus de lesão identificados em animais dos grupos estudados segundo o escore de Park Chiu.

Figura 18 - Grau 0, correspondente a mucosa intestinal normal. **Figura 19** - Grau 2 em que é possível visualizar aumento dos espaços entre as vilosidades. **Figura 20** - Escore 3, com destruição da porção livre das vilosidades e dilatação de capilares. **Figura 21** - Grau 5, onde é possível inclusive visualizar a destruição da lâmina própria do epitélio

Não houve diferença entre a histologia intestinal dos grupos estudados segundo o escore de Park-Chiu (Figura 22, Anexo P).

Figura 22 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da classificação histológica intestinal. Valor de $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis)

4.8.2 Histologia hepática

Não houve diferença entre a histologia hepática dos grupos estudados (Figura 23, Anexo Q).

Figura 23 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da classificação histológica hepática. Valor de p não significativo (Kruskal-Wallis)

4.8.3 Histologia cardíaca

Não houve diferença entre a histologia cardíaca dos grupos estudados (Figura 24, Anexo R).

Figura 24 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis da classificação histológica cardíaca. Valor de p não significativo (Kruskal-Wallis)

4.9 Dosagem de transaminases séricas

4.9.1 Dosagem sérica de AST

Houve redução significativa dos níveis séricos de AST no grupo Diazóxido em relação aos demais. Não houve diferença entre os grupos Sham e Controle (Figura 25, Anexo S).

Figura 25 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de AST sérico (mU/mL). Valor de p significativo para Diazóxido x Controle e Diazóxido x Sham. (Kruskal-Wallis, Dunn)

4.9.2 Dosagem sérica de ALT

Não foi encontrada diferença entre os níveis séricos de ALT entre os grupos estudados (Figura 26, Anexo T).

Figura 26 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartis dos níveis de ALT sérico (U/L). Valor de p não significativo (Kruskal Wallis)

4.9.3 Dosagem sérica de troponina

Os grupos Controle e Diazóxido apresentaram valores inferiores aos do grupo Sham, sem diferença entre os dois primeiros (Figura 27, Anexo U).

Figura 27 - Valores de mediana, mínimo, máximo e interquartil dos níveis de troponina sérica (ng/mL). Valor de p significativo (ANOVA uma via; Tukey): Controle x Sham e Diazóxido x Sham

5. DISCUSSÃO

A reperfusão é o mais importante componente da lesão intestinal durante a I/R⁷⁴. Uma vez que existe relação entre esta e a DMOS (Figura 2), a redução da injúria intestinal poderia proporcionar menos complicações e impactar na mortalidade em UTIs cirúrgicas.

Foram desenvolvidos modelos animais de I/R intestinal em gatos, porcos e roedores sob diversas intervenções. O modelo de isquemia intestinal escolhido é o mais utilizado, tem simples realização, foi amplamente estudado, é adequado para retratar a isquemia oclusiva e permite estudar a reperfusão. No entanto induz resposta orgânica de estresse ao trauma cirúrgico da laparotomia⁷⁵. Levando em conta esse fato, utilizamos um grupo Sham submetido a laparotomia sem indução de I/R (Figuras 3 e 4).

A oclusão completa da circulação na AMS por uma hora resulta em lesão do epitélio do terço superior dos vilos⁷⁵ conforme estudos semelhantes no mesmo modelo^{74,76}. Em humanos, enquanto uma isquemia de 30 minutos não causou dano, o tempo de 45 minutos foi suficiente para lesão intestinal irreversível^{77,78}. Diante disso, optamos pelo tempo de isquemia de uma hora.

A duração da reperfusão levou em conta a dinâmica da população bacteriana dentro do intestino e sua passagem através deste. É descrito que, após a lesão, seis horas é o tempo mínimo para observar colonização bacteriana à distância, sendo que quando a causa é a pancreatite aguda

podem ser necessários 12 horas para o início e 4 dias para atingir o pico⁷⁹. Há aumento de ICAM-1, mieloperoxidase e disfunção endotelial em órgãos remotos após seis horas de I/R intestinal⁸⁰. Finalmente, em estudo utilizando modelo de I/R semelhante ao nosso, observou-se que, após 30 minutos de isquemia e 1-2 horas de reperfusão, a proliferação bacteriana no jejuno proximal é máxima após 12h, com níveis posteriores decrescentes⁸¹.

O diazóxido tem mecanismo de ação semelhante ao pré-condicionamento isquêmico, que é efetivo na proteção contra I/R, e teve benefício comprovado em outros órgãos⁵⁸⁻⁶⁴. Com relação ao fígado, demonstramos em outros estudo que houve manutenção da função mitocondrial hepática, aumento da tolerância do órgão a I/R e redução da resposta inflamatória sistêmica, em modelo de I/R hepática em ratos que receberam diazóxido⁸². O interesse nesse trabalho em estudar também o coração decorreu do fato de ser o órgão mais estudado no que tange a benefícios associados ao uso da droga.

A isquemia intestinal tem dificuldade em se correlacionar a marcadores séricos, possivelmente por sobreposição de biomarcadores com outros de lesão sistêmica ou pela ação do metabolismo hepático, que degrada substâncias provenientes do intestino através da veia porta⁷⁸. No entanto, a proteína citoplasmática IFABP presente nos enterócitos das extremidades das vilosidades intestinais pode ser encontrada na circulação após a morte destas células⁸³, sendo por tal uma forte candidata a marcadora sérica de lesão intestinal⁸⁴.

Em estudo com ratos e modelo semelhante ao que escolhemos,

utilizando reperfusão de 2 horas e tempos crescentes de isquemia, observou-se aumento de IFABP a partir de 30 minutos de isquemia, antecedendo inclusive alterações histológicas⁷⁸.

Em humanos, no entanto, estudo demonstrou que durante a isquemia jejunal há um grande aumento da dosagem sérica, que se reduz acentuadamente nos primeiros 30 minutos da reperfusão, de forma a se tornar indetectável após 120 minutos⁷⁷.

Embora tenhamos tido valores mensuráveis em ambos os grupos, não identificamos diferença entre eles (Figura 4), o que diferiu do que imaginávamos encontrar e pode ter ocorrido devido ao tempo do nosso estudo. Não encontramos dados na literatura envolvendo períodos de observação mais longos.

A sinalização através de citocinas é uma resposta coordenada que ativa o sistema imunológico, da qual participam espécies pró e antiinflamatórias^{26,40}. É descrito que durante a I/R intestinal há aumento sérico de IL-6, IL-10, TNF- α e lactato a partir de 45 minutos de isquemia e trinta minutos de reperfusão⁷⁶.

Em nosso estudo, as amostras séricas não evidenciaram mensuração de IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-10 após 12 horas de reperfusão. Foram identificados valores para TNF α e MCP-1, porém sem diferença entre os grupos estudados (Figuras 5 e 6). Na literatura, há descrição de elevação de TNF α até 4 horas de reperfusão, mas não há dados após. Em estudo com isquemia intestinal de 1 hora e igual duração de reperfusão, foi descrito valores de TNF α entre 8-10 pg/mL⁷⁶. No presente estudo, encontramos mediana de

0,37 pg/mL no grupo Salina (reperfusão de 12 horas), o que nos mostra que seu aparecimento no plasma é precoce e breve, e que após 12 horas o nível sérico é semelhante ao do grupo não submetido a I/R (já que não houve diferença entre os três grupos).

Quanto às citocinas intestinais, uma hora de isquemia e o mesmo tempo de reperfusão já permitem observar no intestino aumento de citocinas como IL-6 e TNF α ⁷⁶. Em nosso caso, não encontramos no tecido intestinal diferença significativa nos níveis de expressão gênica de TNF α ou IL-10 (Figuras 7 e 8), porém evidenciamos redução da expressão de IL-6 no grupo Diazóxido comparado ao grupo Salina (Figura 9). Uma vez que em modelos animais com deleção do gene associado a IL-6 há redução da disfunção da barreira intestinal após choque hemorrágico³⁴, isquemia e reperfusão intestinal³² e sepse⁸⁵, nosso resultado nos leva a concluir que o diazóxido reduz o dano intestinal causado pela I/R. Além disso, a persistência do aumento da expressão de IL-6 no intestino dos animais com I/R após 12 horas, enquanto os níveis séricos não estão elevados, sugere que nesse momento o intestino pode continuar a ser uma fonte de inflamação para o organismo.

Quanto a expressão de citocinas no fígado, os dados mostraram maior expressão de IL-10 no grupo Salina comparado ao Diazóxido (Figura 11), enquanto não houve diferenças para TNF α e IL-6 (Figuras 10 e 12). Esse resultado chama atenção pela diferença em relação a estudo de I/R intestinal com duração de 2 horas (1 hora de isquemia e 1 hora de reperfusão), em que houve no fígado redução de IL-10, com aumento de TNF α e IL-6⁷⁶. Tais mudanças podem fazer parte da evolução da resposta inflamatória, sendo possível que a menor elevação de IL-10 no grupo Diazóxido seja consequência

de menor reação inflamatória e dano neste grupo, pelo seu caráter anti-inflamatório. O estudo demonstrou diferença entre os mediadores inflamatórios em cada órgão num mesmo momento, sugerindo que a resposta inflamatória é compartimentalizada⁷⁶, o que foi igualmente demonstrado em nossos dados.

Trabalho prévio demonstrou que a COX-2 intestinal é uma importante enzima relacionada a síntese de prostanóides e modula a função da barreira intestinal, uma vez que sua expressão em excesso está associada a aumento da permeabilidade³⁹. Em trabalho anterior utilizando um modelo experimental de pancreatite, observamos aumento da permeabilidade intestinal e da translocação bacteriana associadas a aumento da infecção pancreática em ratos idosos, os quais demonstraram elevação da expressão de COX -2 no intestino⁸⁶.

No presente estudo, o grupo Diazóxido expressou COX-2 em quantidade inferior a Salina (Figura 13). Dessa forma, concluímos que o medicamento é capaz de diminuir a lesão da barreira intestinal. Com relação a COX-2 hepática, nosso estudo não demonstrou diferença entre os grupos (Figura 14).

Conforme descrito anteriormente, I/R intestinal é uma das causas mais comuns de disfunção da barreira intestinal, intimamente ligada às TJ⁸⁷. Durante I/R, é sabido que ocorre internalização de proteínas responsáveis por reduzir a permeabilidade e aumento da expressão na membrana celular de proteínas ligadas a aumento de permeabilidade⁸⁸, o que dificulta o seu estudo.

A resolução da resposta inflamatória é altamente regulada, e a agressão deflagra precocemente processos regenerativos, cuja rapidez e eficiência são

ferramentas de defesa. Durante I/R intestinal, tais mecanismos incluem o fechamento dos espaços paracelulares, através da reestruturação das TJ²⁴. Há, portanto, aumento da transcrição gênica de seus componentes como parte do processo regenerativo, o que nos levou a estudá-los através da técnica de PCR.

Nossa avaliação não encontrou diferença na expressão de ocludina e JAM-A entre os grupos Salina e Diazóxido (Figuras 15 e 16). No entanto, níveis mais baixos de ZO-1 foram encontrados no grupo Diazóxido-12 (Figura 17).

Como o aumento da expressão de ZO-1, JAM-A e ocludina é resultado do processo de reparação, e uma vez que estamos diante de um modelo de lesão moderada e não-letal, conforme os dados de histologia apresentados, inferimos que o aumento de transcrição descrito é proporcional ao dano sofrido. De forma contrária, em nosso trabalho de pancreatite anteriormente citado, ratos idosos apresentaram maior expressão de COX-2, maior dano histológico, maior translocação e menor expressão de JAM-A, ZO-1 e ocludina, associados a uma capacidade de regeneração mais limitada nesse grupo⁷⁸.

O melhor método disponível para estudar a histologia intestinal após lesão de I/R é o escore de Park Chiu⁸⁹ (Figuras 18, 19, 20 e 21). Estudo em ratos submetidos a uma hora de isquemia e seis horas de reperfusão demonstrou piora progressiva associada ao tempo de reperfusão⁸⁸, com escore médio de Park Chiu de 2,5 após seis horas, demonstrando que durante esse período houve regeneração epitelial mínima⁷⁴.

Em nosso estudo, após 12 horas de observação, as medianas foram de 0, 3 e 3 para Sham, Salina e Diazóxido, respectivamente, e o valor máximo

encontrado foi de 5. Tais dados demonstram que o modelo de I/R nos tempos aplicados neste estudo causa lesão intestinal de intensidade moderada, através da diferença encontrada entre os grupos Salina x Sham e Diazóxido x Sham. Não foi evidenciada diferença entre os grupos Salina e Diazóxido (Figura 22). Algumas lâminas com má qualidade técnica e as limitações da análise através de hematoxilina-eosina podem ter dificultado o encontro de outras diferenças. A demora na regeneração histológica descrita, que não ocorreu após 12 horas, nos permite supor que outros períodos de observação podem ser necessários para identificar diferenças através do método escolhido.

O escore de histologia hepática utilizado baseou-se em estudo prévio que realizou isquemia intestinal de 45 minutos seguida de 2 horas de reperfusão, e encontrou mediana de 2 para a lesão do fígado⁶⁹. Em cenário de isquemia intestinal mais prolongada (1 hora e meia) e reperfusão idêntica, no entanto, não foi demonstrada diferença entre histologia hepática ou cardíaca através da coloração por hematoxilina e eosina resultante de I/R intestinal comparado ao grupo Sham⁹⁰, e uma possível explicação poderia ser a duração breve da observação escolhida. No entanto, mesmo após a observação mais longa escolhida no presente estudo, não identificamos diferença entre os grupos estudados tanto para fígado quanto para coração, mesmo havendo alteração macroscópica desses órgãos durante a coleta (Figuras 23 e 24). Do ponto de vista histológico, o modelo não foi capaz de demonstrar lesão remota em fígado e coração.

Quanto aos níveis de AST (Figura 25) e ALT (Figura 26), os primeiros demonstraram redução no grupo Diazóxido quando comparado aos grupos Salina e Sham, sem diferença nos níveis de ALT. Em I/R hepática demonstramos redução de transaminases após o uso de diazóxido⁸², o que foi repetido aqui, porém sem a correspondência histológica. Dessa forma, não podemos concluir que houve proteção ao fígado no cenário estudado.

Segundo a literatura, 1 hora e meia de isquemia intestinal seguida de 2 horas de reperfusão não cursaram com diferença nos níveis de troponina⁹⁰. Em nosso estudo, após 12 horas encontramos diferença (Figura 27), porém os níveis mensurados estão dentro da normalidade para o *kit* utilizado, o que não indica lesão cardíaca identificável em nenhum dos grupos.

Nosso estudo apresentou limitações que podem ser consideradas em trabalhos futuros. Após dose em bolo, a redução da pressão arterial causada pelo diazóxido é máxima em dois minutos. Segue-se uma recuperação progressiva com platô em 10 a 40 minutos, que se mantém por cerca de 4 horas. Em humanos, a dose de 7,5mg/kg reduz a pressão arterial média em 25%⁹¹, e mesmo com uma fisiologia adaptada a frequentes períodos de isquemia, pode haver redução da pressão arterial capaz de causar hipoperfusão intestinal. O controle dessa variação poderia expor um efeito protetor mais potente por parte da medicação.

Ao optar pela quantificação da transcrição gênica, utilizamo-na como medida indireta das proteínas finais, que não foram mensuradas. Além disso, tanto a histologia intestinal quanto as proteínas componentes das TJ podem ser estudada mediante técnicas adicionais, como a imuno-histoquímica.

Ainda com relação às variáveis, tendo em vista que o mecanismo de lesão da I/R é complexo e intrincado, há mediadores de outras cascatas, como a oxidativa, que não foram escolhidos. Essa multiplicidade permite que haja interferências não atenuadas pelo diazóxido.

O modelo escolhido comporta-se como subletal em função dos tempos de isquemia e reperfusão escolhidos⁷⁴, o que nessa situação inviabiliza traçar correlações com a mortalidade. Além disso, é possível que em lesões mais acentuadas o efeito protetor do diazóxido seja mais evidente.

Mesmo não tendo encontrado diferença nos níveis de IFABP ou de histologia, os dados permitem afirmar que o modelo utilizado causou dano ao intestino, e o diazóxido demonstrou proteção, embora não definitiva, nas situações de I/R intestinal. Com relação a coração e fígado, não demonstramos efeito protetor da droga.

6. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, demonstramos que a isquemia e reperfusão intestinal causam dano ao intestino, demonstrado através da observação histológica do órgão. No que tange a fígado e coração, o modelo de I/R intestinal não foi capaz de demonstrar lesão tanto na histologia quanto nos marcadores séricos de cada órgão.

Concluimos que o diazóxido exerce efeito protetor sobre o intestino de ratos após uma hora de isquemia e doze horas de reperfusão, através da redução da expressão gênica de IL-6, COX-2 e ZO-1, marcadores teciduais de lesão e regeneração.

No que tange a análise relativa aos órgãos distantes, com exceção da redução dos níveis séricos de aspartato amino-transferase, não foi possível demonstrar efeito protetor do diazóxido sobre o fígado ou coração.

7. ANEXOS

Anexo A - Aprovação da CEUA-FMUSP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação do impacto do dióxido nas lesões locais e sistêmicas em animais submetidos a isquemia e reperfusão intestinal”** protocolo nº 083/15 sob a responsabilidade de **Marcel Cerqueira Cesar Machado** e **Saulo Fernandes de Mattos Dourado**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 27.05.2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/2017
Espécie/linhagem	Rato
Nº de animais	112
Peso/Idade	02 meses
Sexo	macho
Origem	Biotério ICB

CEUA-FMUSP, 27 de Maio de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua_fm@usp.br

Anexo B - Marcador de lesão intestinal no soro – IFABP

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	258,539	281,175	331,436
2	297,193	322,475	234,689
3	283,3	343,537	327,025
4	341,686	305,141	271,831
5	305,567	290,953	297,761
6	314,799	308,123	280,75
7		284,717	266,455
8		268,011	279,476
9		274,379	344,534
10		362,211	279,051
11		368,204	342,398
12		287,126	342,54
13		304,431	311,957
Mediana	292,9	304,4	297,8
DP	25,23	32,63	35,20

Anexo C - Dosagem sérica de TNF α

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	0,26	0,51	0,33
2	0,26	0,26	0,61
3	0,42	0,26	0,51
4	0,42	0,42	0,29
5	0,26	0,42	0,42
6	0,26	0,51	0,26
7		0,33	0,33
8		0,33	0,33
9		0,42	0,33
10		0,71	0,19
11		1,29*	0,19
12		0,22	0,33
13		0,19	0,51
Mediana	0,26	0,375	0,33
DP	0,082	0,1486	0,1252

* outlier

Anexo D - Dosagem sérica de MCP-1

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	670	907	751
2	547	1222	1009
3	689	580	935
4	893	1035	751
5	863	611	755
6	488	601	716
7		772	707
8		966	893
9		825	641
10		1009	317*
11		5251*	755
12		512	751
13		580	626
Mediana	679,5	798,5	751,0
DP	163	228,1	114,8

* *outlier*

Anexo E - Expressão relativa de TNF α intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1,4044	0,5864	0,6525
2	1,0592	0,1090	0,3278
3	1,1991	0,5109	0,2692
4	0,2977	0,1847	0,3899
5	1,5648	0,1665	0,0792
6	1,2033	0,13813	6,7975*
7		0,3112	0,5629
8		0,2479	0,5700
9		0,7402	0,1563
10		1,9766*	0,0911
11		0,6029	0,0881
12		0,3458	0,2038
13			0,5052
Mediana	1,201	0,3458	0,2985
DP	0,4409	0,2049	0,2087

* *outlier*

Anexo F - Expressão relativa de IL-10 intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	2,044857	0,285389	0,844401
2	1,064370	0,342458	0,389852
3	1,175276	0,079274	0,222211
4	0,371388	0,178501	0,288771
5	1,834008	0,177145	0,024912
6	0,573951	0,595841	3,575141*
7		0,662044	0,975355
8		0,088634	0,542615
9		0,157454	0,471392
10		1,550786	0,062413
11		0,980099	0,020461
12		1,344435	0,110338
13			0,139274
Mediana	1,120	0,3139	0,2555
DP	0,6649	0,5053	0,3172

* *outlier*

Anexo G - Expressão relativa de IL-6 intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1,224761	14,851120	1,645470
2	0,932063	0,445810	4,615542
3	0,945074	37,491720	62,617760*
4	1,440430	3,430693	34,166250
5	1,130139	0,894095	2,291830
6	0,569394	7,333490	1,123111
7		1,317223	6,291919
8		13,282920	2,429232
9		1,245306	0,910986
10		569,084800*	26,109450
11		-	0,552674
12		1,941942	8,008322
13		13,580830	32,751750
Mediana	1,038	3,431	3,522
DP	0,2982	11,07	12,95

* outlier

Anexo H - Expressão relativa de TNF α hepático

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	0,616569	0,593094	1,029064
2	0,885358	0,313673	0,659449
3	0,982367	0,648570	0,970186
4	0,678929	1,017715	0,470196
5	3,191718*	0,391568	0,199482
6	0,860551	0,246615	0,604718
7		0,493915	7,317411*
8		0,658079	1,689192
9		1,871679	0,268563
10		3,861960*	0,452608
11		1,213634	0,419381
12		0,238049	1,409646
13		1,344746	0,518111
Mediana	0,8606	0,6208	0,5614
DP	0,1520	0,5083	0,4602

* outlier

Anexo I - Expressão relativa de IL-10 hepática

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1,178812	3,011189	2,464566
2	0,696567	2,075319	3,779861
3	0,837600	4,771138	12,599840*
4	0,504642	4,390342	1,621505
5	1,858751	1,442262	0,977612
6	1,550070	3,430297	1,649848
7		2,473122	2,645120
8		9,307111	1,940372
9		1,783033	2,495508
10		44,549380*	3,782482
11		-	1,237418
12		2,932911	0,502200
13		2,190611	3,371366
Mediana	1,008	2,933	2,202
DP	0,5235	2,205	1,076

* *outlier*

Anexo J - Expressão relativa de IL-6 hepática

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1,224761	14,851120	1,645470
2	0,932063	0,445810	4,615542
3	0,945074	37,491720	62,617760*
4	1,440430	3,430693	34,166250
5	1,130139	0,894095	2,291830
6	0,569394	7,333490	1,123111
7		1,317223	6,291919
8		13,282920	2,429232
9		1,245306	0,910986
10		-	26,109450
11		569,0848*	0,552674
12		1,941942	8,008322
13		13,580830	32,751750
Mediana	1,038	3,431	3,522
DP	0,2982	11,07	12,95

* *outlier*

Anexo K - Expressão relativa de COX-2 intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1,746540	1,875792	1,197894
2	2,296601	1,569712	0,365895
3	1,186326	2,605391	0,371002
4	0,214418	0,732297	0,670124
5	0,984525	0,236760	0,437241
6	0,995505	4,229538	19,073530*
7		0,964264	1,275002
8		0,380904	1,101523
9		3,51204	1,779535
10		-	0,270275
11		13,319800*	0,769237
12		3,733426	0,934651
13		-	1,855104
Mediana	1,091	1,723	0,8519
DP	0,7145	1,462	0,5392

* outlier

Anexo L - Expressão relativa de COX-2 hepática

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	0,681759	1,060933	3,432675
2	0,960817	0,128010	0,854015
3	0,510270	1,381594	1,291756
4	0,626043	1,929642	1,330837
5	3,814075*	0,502200	0,386981
6	1,252954	1,025504	0,685550
7		0,642752	10,492840*
8		0,618709	3,318045
9		11,121910	0,520992
10		9,09334	1,632783
11		-	1,438269
12		0,574482	2,797879
13		3,618353	1,487957
Mediana	0,6818	1,043	1,385
DP	0,2996	3,630	1,044

* outlier

Anexo M - Expressão relativa de JAM-A intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	4,905839*	0,752884	2,432601
2	-	1,154685	0,605626
3	0,712272	2,163699	0,357125
4	0,273289	1,272354	0,149426
5	0,552291	0,281752	0,278645
6	0,553057	2,296601	17,225810*
7		0,923062	2,051245
8		0,165913	0,877518
9		2,527130	4,156877
10		-	0,063703
11		9,907355*	0,067428
12		1,203720	1,775838
13		-	3,323032
Mediana	0,5527	1,179	0,7416
DP	0,1825	0,8188	1,390

* outlier

Anexo N - Expressão relativa de ocludina intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	8,059368	1,596228	4,862393
2	6,772398	1,728675	0,661892
3	0,484533	3,825549	0,390303
4	0,178212	1,030016	0,166508
5	0,487903	0,302429	0,519670
6	0,434873	2,516933	19,088960*
7		1,834856	3,462146
8		0,332555	1,649086
9		4,855658	1,189757
10		9,664310	0,044553
11		27,240220*	0,049779
12		6,069874	2,131201
13		-	3,646890
Mediana	0,4862	1,835	0,9258
DP	3,649	2,852	1,627

* *outlier*

Anexo O - Expressão relativa de ZO-1 intestinal

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	3,467750	6,475538	6,298464
2	2,517514	1,733875	1,176091
3	0,967947	6,863764	1,196649
4	0,188940	2,381714	0,418994
5	1,031683	0,668037	0,814508
6	0,607097	3,412905	18,113580*
7		0,531816	2,208398
8		5,563528	2,726405
9		7,071420	3,670560
10		10,483150	0,292600
11		3,645205	0,356259
12		-	2,863937
13		2,361985	3,506423
Mediana	0,9998	3,529	1,703
DP	1,258	3,037	1,797

* outlier

Anexo P - Histologia intestinal segundo escore de Park-Chiu

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	0	4	3
2	0	4	1
3	2	3	4
4	2	4	2
5	0	3	3
6	0	1	4
7		0	3
8		1	3
9		2	4
10		2	4
11		4	2
12		2	4
13		5	2
Mediana	0	3	3
DP	1,033	1,494	1,000

Anexo Q - Histologia hepática segundo escore

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1	-	3
2	0	1	1
3	1	1	2
4	2	1	2
5	2	0	2
6	2	1	1
7		2	3
8		2	2
9		2	1
10		1	2
11		1	1
12		2	2
13		2	-
Mediana	1,5	1	2
DP	0,8165	0,6513	0,7177

Anexo R - Histologia cardíaca segundo escore

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	3	1	2
2	3	1	1
3	2	2	2
4	2	0	1
5	3	0	3
6	2	1	3
7		2	3
8		2	1
9		1	3
10		2	3
11		3	1
12		2	1
13		3	2
Mediana	2,5	2	2
DP	0,5477	0,9674	0,9129

Anexo S - Dosagem sérica de AST

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	1,961733	1,180533	0,958267
2	1,977600	1,036133	0,924400
3	1,920133	1,516933	1,200533
4	1,498800	1,297733	0
5	1,546933	1,607467	1,339867
6	2,008533	2,057333	1,241467
7		1,511200	0,598667
8		0,912267	0,158533
9		1,577067	0
10		0,351733	0
11		1,710267	0
12		1,840267	0
13		2,100400	0
Mediana	1,941	1,517	0,1585
DP	0,2316	0,4849	0,5599

Anexo T - Dosagem sérica de ALT

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	20,788	6,945	20,492
2	17,356	7,764	21,293
3	6,433	20,527	22,706
4	7,744	19,932	12,889
5	20,858	21,154	20,019
6	19,721	14,597	18,980
7		16,905	4,664
8		12,946	3,734
9		7,009	20,823
10		7,199	18,340
11		22,604	22,449
12		19,051	14,912
13		21,691	18,572
Mediana	18,54	16,91	18,98
DP	6,638	6,197	6,286

Anexo U - Dosagem sérica de troponina

Rato	Sham	Salina	Diazóxido
1	<i>0,504</i>	<i>0</i>	<i>0,075</i>
2	<i>0,677</i>	<i>0,556</i>	<i>0</i>
3	<i>0,582</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
4	<i>0,504</i>	<i>0,305</i>	<i>0,243</i>
5	<i>0,268</i>	<i>0,352</i>	<i>0</i>
6	<i>0,633</i>	<i>0</i>	<i>0,313</i>
7		<i>0,710</i>	<i>0,133</i>
8		<i>0,213</i>	<i>-</i>
9		<i>0,144</i>	<i>0</i>
10		<i>0</i>	<i>0,093</i>
11		<i>0</i>	<i>0,297</i>
12		<i>0,352</i>	<i>0</i>
13		<i>0,386</i>	<i>0,238</i>
Mediana	<i>0,5430</i>	<i>0,2130</i>	<i>0,084</i>
DP	<i>0,1448</i>	<i>0,2360</i>	<i>0,1252</i>

8. REFERÊNCIAS

1. Oldenburg A, Lau L, Rodenberg T, Edmonds H, CD B. Acute mesenteric ischemia. *Arch Intern Med.* 2004;164:1054-1062. doi:10.1002/ccd.22261.
2. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia / reperfusion : microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396:13-29. doi:10.1007/s00423-010-0727-x.
3. Yasuhara H. Acute Mesenteric Ischemia: The Challenge of Gastroenterology. *Surg Today.* 2005;35:185-195. doi:10.1007/s00595-004-2924-0.
4. Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CHC, Derikx JPM. Life and death at the mucosal-luminal interface: New perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. *World J Gastroenterol.* 2016;22(9):2760. doi:10.3748/wjg.v22.i9.2760.
5. MacFie J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br Med Bull.* 2004;71:1-11. doi:10.1093/bmb/ldh029.
6. Eldrup-Jorgensen J, Hawkins RE, Bredenberg CE. Abdominal vascular catastrophes. *Surg Clin North Am.* 1997;77(6):1305-1320. doi:10.1016/S0039-6109(05)70619-8.
7. Acosta S. Epidemiology of Mesenteric Vascular Disease : Clinical Implications. *Semin Vasc Surg.* 2010;23(1):4-8. doi:10.1053/j.semvascsurg.2009.12.001.
8. Collard CD, Gelman S. Prevention of Ischemia – Reperfusion Injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-1138.
9. Rotstein ORID. Pathogenesis of Multiple Organ Dysfunction Syndrome : 2000;1(3).
10. Carver TW, Vora RS, Taneja A. Mesenteric Ischemia. *Crit Care Clin.* 2016;32(2):155-171. doi:10.1016/j.ccc.2015.11.001.
11. Katseni K, Chalkias A, Kotsis T, et al. The Effect of Perioperative Ischemia and Reperfusion on Multiorgan Dysfunction following Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/598980.
12. Lenaerts K, Ceulemans LJ, Hundscheid IHR, Grootjans J, Dejong CHC, Olde Damink SWM. New insights in intestinal ischemia-reperfusion

- injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(3):298-303. doi:10.1097/MOT.0b013e32835ef1eb.
13. Shen L, Turner JR. Role of Epithelial Cells in Initiation and Propagation of Intestinal Inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G577-G582. doi:10.1152/ajpgi.00439.2005.
 14. France MM, Turner JR. CELL SCIENCE AT A GLANCE The mucosal barrier at a glance. 2017;(January):1-8. doi:10.1242/jcs.193482.
 15. Balda MS, Matter K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;42:94-101. doi:10.1016/j.ceb.2016.05.006.
 16. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. *Annu Rev Physiol*. 2011;73(1):283-309. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142150.
 17. Buckley A, Turner JR. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017. doi:10.1101/cshperspect.a029314.
 18. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;38:16-25. doi:10.1016/j.semcdb.2014.11.004.
 19. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000;11(12):4131-4142. doi:10.1091/mbc.11.12.4131.
 20. Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, et al. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell*. 2013;24(19):3056-3068. doi:10.1091/mbc.E12-09-0688.
 21. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(6):323-337. doi:10.1016/S1537-1891(02)00200-8.
 22. Tornavaca O, Chia M, Dufton N, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*. 2015;208(6):821-838. doi:10.1083/jcb.201404140.
 23. Van Spaendonk H, Ceuleers H, Witters L, et al. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J Gastroenterol*. 2017;23(12):2106-2123. doi:10.3748/wjg.v23.i12.2106.
 24. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*. 2007;87(2):545-564. doi:10.1152/physrev.00012.2006.

25. Sertaridou E, Papaioannou V, Kolios G, Pneumatikos I. Gut failure in critical care: Old school versus new school. *Ann Gastroenterol.* 2015;28(3):307-320.
26. Leaphart CL, Iii JJT. Surgical research review The gut is a motor of organ system dysfunction. :563-569. doi:10.1016/j.surg.2007.01.021.
27. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras.* 2005;20(4). doi:10.1590/S0102-86502005000400013.
28. Chuanyu Li, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia- reoxygenation injury. *Rev Lit Arts Am.* 2002;282:C227-C241. doi:10.1080/10715760410001727858.
29. DA Parks DG. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986;250(6):G749-G753.
30. Balzan S, Quadros CDA, Cleve R De, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. 2007;22:464-471. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x.
31. Yao YM, Bahrami S, Redl H, Fuerst S, Schlag G. IL-6 release after intestinal ischemia/reperfusion in rats is under partial control of TNF. *J Surg Res.* 1997;70(1):21-26. doi:10.1006/jsre.1997.5074.
32. Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, et al. IL-6 Knockout Mice Exhibit a Resistance To Splanchnic Artery Occlusion Shock. *Shock.* 2003;20(II):230-236. doi:10.1097/00024382-200309000-00006.
33. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(4):631-659. doi:10.1007/s00018-012-1070-x.
34. Yang R, Han X, Uchiyama T, et al. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol liver Physiol.* 2003;285(3):G621-9. doi:10.1152/ajpgi.00177.2003.
35. Bagheri F, Khor V, Mohammad A, Khalighfard S, Khodayari S, Khodayari H. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci.* 2016;165:43-55. doi:10.1016/j.lfs.2016.09.013.
36. Short SS, Wang J, Castle SL, et al. Low doses of Celecoxib attenuate gut barrier failure during experimental peritonitis. *Lab Invest.* 2013;93(12):1265-1275. doi:10.1038/labinvest.2013.119.
37. Wallace JL, Devchand PR. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. *Br J Pharmacol.* 2005;145(3):275-282. doi:10.1038/sj.bjp.0706201.
38. Rodríguez-lagunas MJ, Martín-Venegas R, Moreno JJ, Ferrer R. PGE 2

- promotes Ca²⁺-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299:C324–C334. doi:10.1152/ajpcell.00397.2009.
39. Pontarelli EM, Short SS, Wang J, Grishin A, Ford HR. Intestine-specific overexpression of Cox-2 induces gut barrier failure. *J Am Coll Surg*. 2013;217(3):S13. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.07.009.
 40. Kuniaki Ejima, Matthew D. Layne, Irvith M. Carvajal, Patricia A. Kritek, Rebecca M. Baron, Yen-Hsu Chen, Jeffrey vom Saal, Bruce D. Levy S-FY and MAP. Cyclooxygenase-2 deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J*. 2003;(2):533-538. doi:10.1096/fj.02-1078fje.
 41. Gatt M, Dy BSRED, Macfie J. Review article : bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. 2007;(August 2006):741-757. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03174.x.
 42. Steinberg SM. Bacterial translocation: What it is and what it is not. *Am J Surg*. 2003;186(3):301-305. doi:10.1016/S0002-9610(03)00220-4.
 43. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 1979;23(2):403-411.
 44. MacFie J, Reddy BS, Gatt M, Jain PK, Sowdi R, Mitchell CJ. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br J Surg*. 2006;93(1):87-93. doi:10.1002/bjs.5184.
 45. Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: What is important in human beings? *Surgery*. 2002;131(3):241-244. doi:10.1067/msy.2002.116408.
 46. Deitch EA. Gut-origin sepsis: Evolution of a concept. *Surgeon*. 2012;10(6):350-356. doi:10.1016/j.surge.2012.03.003.
 47. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, et al. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma*. 1991;31(5):629-636. doi:10.1097/00005373-199105000-00006.
 48. Kaneko H, Tamura A, Ishii T, et al. Bacterial translocation in small intestinal ischemia-reperfusion injury and efficacy of Anti-CINC antibody treatment. *Eur Surg Res*. 2007;39(3):153-159. doi:10.1159/000100328.
 49. Vaishnavi C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31(4):334-342. doi:10.4103/0255-0857.118870.
 50. Carrico C, JL M, JC M, Fry D, RV M. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg*. 1986;121(2):196-208. doi:10.1001/archsurg.1986.01400020082010.
 51. Mira JC, Brakenridge SC, Moldawer LL, Moore FA. Persistent

- Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit Care Clin.* 2017;33(2):245-258. doi:10.1016/j.ccc.2016.12.001.
52. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth.* 2015;114(2):204-216. doi:10.1093/bja/aeu302.
53. Miura T, Miki T. ATP-sensitive K⁺ channel openers: old drugs with new clinical benefits for the heart. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003;1(3):251-258. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L39668101>.
54. Coetzee WA. Pharmacology & Therapeutics Multiplicity of effectors of the cardioprotective agent , diazoxide. *Pharmacol Ther.* 2013;140(2):167-175. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.06.007.
55. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 2015;116(4):674-699. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.
56. Camara-Lemarroy CR. Remote ischemic preconditioning as treatment for non-ischemic gastrointestinal disorders: Beyond ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2014;20(13):3572-3581. doi:10.3748/wjg.v20.i13.3572.
57. Penna C, Perrelli MG, Tullio F, et al. Diazoxide postconditioning induces mitochondrial protein S-Nitrosylation and a redox-sensitive mitochondrial phosphorylation/translocation of RISK elements: No role for SAFE. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(5). doi:10.1007/s00395-013-0371-z.
58. Deja MA, Golba KS, Kolowca M, Organbath S, Elektronik HS. Diazoxide Provides Protection to Human Myocardium In Vitro That Is Concentration. 2004;4975(3). doi:10.1016/S0003-4975(03)01295-5.
59. Deja MA, Malinowski M, Go S, Kajor M. Diazoxide protects myocardial mitochondria , metabolism , and function during cardiac surgery: A double-blind randomized feasibility study of diazoxide-supplemented cardioplegia. 137(4). doi:10.1016/j.jtcvs.2008.08.068.
60. Bari F, Busija DW, Lenzser G, Kis B, Bari F, Busija DW. Diazoxide preconditioning attenuates global cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* 2005;1051(1-2):72-80. doi:10.1016/j.brainres.2005.05.064.
61. Moghtadaei M, Habibey R. Skeletal muscle post-conditioning by diazoxide , anti-oxidative and anti-apoptotic mechanisms. 2015;(2012):11093-11103. doi:10.1007/s11033-012-2015-z.
62. Yong Wang, Shusen Wang , Tricia Harvat, Katie Kinzer, Lisa Zhang, Feng Feng, Meirigeng Qi JO. Diazoxide, a KATP Channel Opener, Prevents Ischemia-Reperfusion Injury in Rodent Pancreatic Islets. *Cell*

- Transplant*. 2013;1-30. doi:10.3727/096368913X673441.
63. Guo W, Ge D, Wang Q, et al. Diazoxide Decreases Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model of Lung Transplantation. *Transplant Procee*. 2011;43:2510-2516. doi:10.1016/j.transproceed.2011.04.015.
 64. Roseborough G, Gao D, Chen L, Trush MA, Zhou S. The Mitochondrial K-ATP Channel Opener , Diazoxide , Prevents Ischemia-Reperfusion Injury in the Rabbit Spinal Cord. *Am J Pathol*. 2006;168(5):1443-1451. doi:10.2353/ajpath.2006.050569.
 65. Couto SER. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao Status Sanitário. In: *Animais de Laboratório: Criação E Experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002:59-64.
 66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*. 2001;25:402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
 67. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-85. doi:10.2144/05391RV01.
 68. Chiu C-J. Intestinal Mucosal Lesion in Low-Flow States. *Arch Surg*. 1970;101(4):478. doi:10.1001/archsurg.1970.01340280030009.
 69. Li Q, Wang Y, Yan X, Chen K. Transduced PEP-1-Heme Oxygenase-1 Fusion Protein Reduces Remote Organ Injury Induced by Intestinal Ischemia / Reperfusion. 2015:1057-1065. doi:10.12659/MSM.893924.
 70. Whitley E, Ball J. Statistics review 5: Comparison of means. *Crit Care*. 2002;6(5):424-428. doi:10.1186/cc1820.
 71. Whitley E, Ball J. Statistics review 6: non-parametric methods . *Crit Care*. 2002;6(1):66-71. doi:10.1186/cc1820.
 72. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 9: One-way analysis of variance. *Crit Care*. 2004;8(2):130-136. doi:10.1186/cc2836.
 73. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 10: Further nonparametric methods. *Crit Care*. 2004;8(3):196-199. doi:10.1186/cc2857.
 74. Rosero O, Ónody P, Kovács T, et al. Impaired intestinal mucosal barrier upon ischemia-reperfusion: “patching holes in the shield with a simple surgical method.” *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/210901.
 75. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. 2015;(7). doi:10.1152/ajpgi.00112.2013.
 76. Collange O, Charles AL, Lavaux T, et al. Compartmentalization of inflammatory response following gut ischemia reperfusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2015;49(1):60-65. doi:10.1016/j.ejvs.2014.10.022.

77. Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JPM, et al. Human Intestinal Ischemia-Reperfusion–Induced Inflammation Characterized. *Am J Pathol*. 2010;176(5):2283-2291. doi:10.2353/ajpath.2010.091069.
78. Khadaroo RG, Fortis S, Salim SY, Streutker C, Churchill TA, Zhang H. I-FABP as biomarker for the early diagnosis of acute mesenteric ischemia and resultant lung injury. *PLoS One*. 2014;9(12):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0115242.
79. Foitzik T, Mithöfer K, Ferraro MJ, et al. Time course of bacterial infection of the pancreas and its relation to disease severity in a rodent model of acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg*. 1994;220(2):193-198.
80. Olanders K, Sun Z, Borjesson A, et al. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock*. 2002;18(1):86-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095141>.
81. Hoehn RS, Seitz AP, Jernigan PL, Gulbins E, Edwards MJ. Ischemia/Reperfusion Injury Alters Sphingolipid Metabolism in the Gut. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(4):1262-1270. doi:10.1159/000447831.
82. Nogueira MA, Coelho AM, Sampietre SN, et al. Beneficial effects of adenosine triphosphate-sensitive K(+) channel opener on liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):19-2840 (Electronic):15319-15326. doi:10.3748/wjg.v20.i41.15319.
83. Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L, et al. Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am J Physiol*. 2011;(February):803-814. doi:10.1152/ajpgi.00229.2010.
84. Machado MCC, Barbeiro HV, da Silva FP, de Souza HP. Circulating fatty acid binding protein as a marker of intestinal failure in septic patients. *Crit Care*. 2012;16(6):455-456. doi:10.1186/cc11653.
85. Wang Q, Fang CH, Hasselgren P, Fang CHUI. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281:1013-1023.
86. Barbeiro DF, Koike MK, Coelho AM, Da Silva FP, Cesar Machado MC. Intestinal barrier dysfunction and increased COX-2 gene expression in the gut of elderly rats with acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2016;16(1):52-56. doi:10.1016/j.pan.2015.10.012.
87. Idrovo J-P, Yang W-L, Jacob A, et al. AICAR attenuates organ injury and inflammatory response after intestinal ischemia and reperfusion. *Mol Med*. 2014;20:676-683. doi:10.2119/molmed.2014.00134.

88. Li Q, Zhang Q, Wang C, et al. Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9 B):4061-4076. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00975.x.
89. Quaedackers JSLT, Beuk RJ, Bennet L, et al. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transplant Proc*. 2000;32(6):1307-1310. doi:10.1016/S0041-1345(00)01238-0.
90. Wang M, Verhaegh R, Tsagakis K, et al. Impact of Acute Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury on Hemodynamics and Remote Organs in a Rat Model. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2017. doi:10.1055/s-0037-1603935.
91. Ogilvie RI, Sitar DS. Diazoxide Concentration-Response Relation in Hypertension. *Hypertension*. 1982;4(1):167-174.