

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**RAFAEL INACIO BRANDÃO**

**EFEITO DO ALOPURINOL E DO PÓS-CONDICIONAMENTO NA INIBIÇÃO DO  
TRAUMATISMO POR REPERFUSÃO APÓS ISQUEMIA DA AORTA INFRA-  
RENAL EM RATOS**

**PONTA GROSSA  
2016**

**RAFAEL INACIO BRANDÃO**

**EFEITO DO ALOPURINOL E DO PÓS-CONDICIONAMENTO NA INIBIÇÃO DO  
TRAUMATISMO POR REPERFUSÃO APÓS ISQUEMIA DA AORTA INFRA-  
RENAL EM RATOS**

Defesa de mestrado, apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, como requisito parcial à obtenção de título de mestre.

Orientadora: Dra. Katia Sabrina Paludo

Co-orientador: Dr. Ricardo Zanetti Gomes

**PONTA GROSSA  
2016**

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

B817 Brandão, Rafael Inacio  
Efeito do alopurinol e do pós-  
condicionamento na inibição do  
traumatismo por reperfusão após  
isquemia da aorta infra-renal em  
ratos/ Rafael Inacio Brandão. Ponta  
Grossa, 2016.  
78f.

Dissertação (Mestrado em Ciências  
Biomédicas - Área de Concentração:  
Biologia Celular e Molecular),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Katia Sabrina  
Paludo.  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo  
Zanetti Gomes.

1.Antioxidante. 2.Isquemia.  
3.Reperfusão. I.Paludo, Katia Sabrina.  
II. Gomes, Ricardo Zanetti. III.  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Mestrado em Ciências Biomédicas. IV. T.

CDD: 616



Universidade Estadual de  
Ponta Grossa



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 08/2016, DO MESTRANDO RAFAEL INÁCIO BRANDÃO REALIZADO NO DIA 14 DE MARÇO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

Aos quatorze dias de março de dois mil e dezesseis, às 13h30min, na sala 107, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Dra. Kátia Sabrina Paludo reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando Rafael Inácio Brandão na linha de pesquisa; Bioquímica dos Processos Celulares, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Professor Dr. Marcelo Machado Ferro (UEPG[PR]) e Professora Pós-Dra. Regina de Sordi (membro externo). Iniciado os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para argüição. O título da dissertação avaliada foi: EFEITO DO ALOPURINOL E DO PÓS-CONDICIONAMENTO NA INIBIÇÃO DO TRAUMATISMO POR REPERFUSÃO APÓS ISQUEMIA DA AORTA INFRA-RENAL EM RATOS. Encerrado a defesa e a ós reunião, a banca comunicou o resultado final da \_\_\_\_\_ avaliação da dissertação como APROVADA considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015 ,referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

---

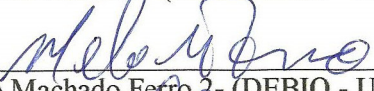
---

---

Alteração de título: sim *anã* CI

Novo título: \_\_\_\_\_

  
Kátia Sabrina Paludo 1- (DEBIOGEM - UEPG) - Presidente

  
Marcelo Machado Ferro 2- (DEBIO - UEPG) – Titular

  
Regina de Sordi MBRO - EXTERNO) Titular

Ponta Grossa, 14 de março de 2016.

Pró — Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação  
Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas, biologia celular e molecular e fisiologia e fisiopatologia —  
ppgbíomedicas@uepg.br  
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - Ponta Grossa - Paraná - Brasil - CEP: 84030-900

Dedico,

À minha mãe Denise, pelo amor incondicional que fez de mim uma pessoa um pouco melhor.

Ao meu pai Ailton, pelos rígidos preceitos que nortearam minha formação tornando-me um pouco mais resiliente e pragmático.

À Mara, companheira de todas as horas nos últimos dezesseis anos. A caminhada ao seu lado tem sido um privilégio.

À minha filha Rafaela que tem me mostrado o verdadeiro significado da vida. Nada me faz mais feliz ou me dá mais prazer do que estar ao seu lado.

Ao meu filho Heitor que nascerá em breve e tem sido ansiosamente aguardado.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Katia Sabrina Paludo, pelo valioso auxílio, orientação e infundável espírito acadêmico.

Ao Dr. Ricardo Zanetti Gomes pela oportunidade de convívio e orientação neste estudo.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, minha gratidão, respeito e apreço.

À Mestranda Caroline Belló e ao grupo do professor José Carlos Velloso pela colaboração com a Determinação da Capacidade Antioxidante Total.

Aos Acadêmicos de medicina Luana Lopes e Felipe Linhares por sua colaboração.

A Todos, que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho se efetivasse.

## RESUMO

A isquemia é um dos problemas mais frequentes e desafiadores com que os cirurgiões vasculares se defrontam e é ao mesmo tempo paradoxal, pois, ao restabelecer o fluxo sanguíneo para um tecido podem ser desencadeadas alterações locais ou sistêmicas mais intensas que a isquemia *per se*. Estas complicações estão relacionadas com a liberação de radicais livres de oxigênio. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do antioxidante alopurinol e do pós condicionamento isquêmico (PCi), que são ciclos de reperfusão intercalados com ciclos de isquemia, sobre as consequências deletérias da isquemia seguida de reperfusão em um modelo de isquemia padronizado em membros caudais de ratos. Este estudo foi aprovado pelo CEUA da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para tanto foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos: Grupo A (SHAM): animais que não foram submetidos a isquemia dos membros caudais; Grupo B : animais submetidos a 2 horas de isquemia e reperfusão apenas uma vez; Grupo C : animais receberam, por gavagem a dose de 100 mg/kg de alopurinol, uma hora antes do procedimento cirúrgico, depois foram submetidos a 2 horas de isquemia e reperfusão apenas uma vez; Grupo D: animais foram submetidos a 2 horas de isquemia e três ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de isquemia (dois minutos cada) e Grupo E : animais receberam dose de 100 mg/kg de alopurinol, uma hora antes do procedimento cirúrgico, depois submetidos a 2 horas de isquemia e três ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de isquemia (dois minutos cada). Três dias após foram coletadas amostras de sangue para análises bioquímicas: Ureia, Creatinina, Aspartato aminotransferase, Alanina aminotransferase, Creatinoquinase, Lactato e mensuração da capacidade antioxidante total pelo método baseado no 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e coleta de segmentos do intestino delgado para análises histológicas. Foi observado efeito protetor do uso de alopurinol e do Pós condicionamento isquêmico através da mensuração da creatinina, AST, ALT e lactato, que preveniram o aumento causado pela isquemia. Com relação a Capacidade Antioxidante Total, ficou evidente o benefício do PCi, mas não do alopurinol. Em relação as análises histológicas, ambos os métodos foram eficazes em minimizar os efeitos lesivos do processo de isquemia e reperfusão mesentérica. Logo pode-se concluir que, o alopurinol e mais notadamente o PCi exerceram efeito protetor, alcançando significância estatística.

**Palavras chave:** antioxidante, isquemia, reperfusão.



## ABSTRACT

Ischemia is one of the most common and challenging problems that vascular surgeons are facing and is at the same time paradoxical, therefore, to restore blood flow to a tissue can be triggered local or systemic changes more intense than ischemia *per se*. These complications are related to release of oxygen free radicals. The aim of this study was to evaluate the effects of allopurinol antioxidant and post ischemic conditioning on the deleterious effects of ischemia followed by reperfusion in a standardized ischemia model in rat members' flows. This study was approved by CEUA the State University of Ponta Grossa. Therefore, we used 30 Wistar rats, female, approximately 3 months old. The animals were randomly divided into five groups: Group A (SHAM ): Animals that were not subjected to ischemia of the caudal members; Group B: Animals subjected to 2 hours of ischemia and reperfusion only once; Group C: animals were given by gavage at a dose of 100 mg / kg of allopurinol, one hour before surgery, they were then subjected to 2 hours of ischemia and reperfusion only once; Group D: Animals were subjected to 2 hours of ischemia and three reperfusion cycles (two minutes each) interleaved with three ischemia cycles (two minutes each) and Group E: Animals received 100 mg / kg of allopurinol, one hour before the surgical procedure, then subjected to 2 hours of ischemia and reperfusion for three cycles (two minutes each) interleaved with three cycles of ischemia (two minutes each). Three days after Blood samples were collected for biochemical analysis: Urea, Creatinine, Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Creatine kinase, Lactate and measurement of the total antioxidant capacity by the method based on 2,2'- azinobis 3- ethylbenzothiazoline -6- acid sulfonic (ABTS) and collection segments of the small intestine for histological analysis. It was observed protective effect of the use of allopurinol and Post conditioning (PCi) ischemic by measuring creatinine, AST, ALT and lactate, which did not show a significant increase. Regarding the Total Antioxidant Capacity was evident the benefit of PCi, but not of allopurinol. As to the histological analyzes, both methods were effective in minimizing the harmful effects of ischemia and reperfusion process mesenteric. As a result it can be concluded that allopurinol and especially PCI exerted a protective effect, reaching statistical significance.

Keywords: antioxidant, ischemia, reperfusion.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Eventos bioquímicos da isquemia – reperfusão.....	<b>20</b>
<b>FIGURA 2.</b> Valores do poder do teste em relação ao tamanho amostral.....	<b>32</b>
<b>FIGURA 3-</b> Avaliação dos marcadores plasmáticos de ureia e creatinina.....	<b>42</b>
<b>FIGURA 4-</b> Avaliação dos marcadores plasmáticos de AST e ALT.....	<b>44</b>
<b>FIGURA 5-</b> Avaliação do marcador plasmático creatino quinase – CPK.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 6-</b> Avaliação do marcador plasmático lactato.....	<b>46</b>
<b>FIGURA 7-</b> Avaliação da capacidade antioxidante total – CAT.....	<b>47</b>
<b>FIGURA 8-</b> Imagens histológicas dos animais do grupo A .....	<b>50</b>
<b>FIGURA 9-</b> Imagens histológicas dos animais do grupo B .....	<b>51</b>
<b>FIGURA 10-</b> Imagens histológicas dos animais do grupo C.....	<b>52</b>
<b>FIGURA 11-</b> Imagens histológicas dos animais do grupo D.....	<b>52</b>
<b>FIGURA 12-</b> Imagens histológicas dos animais do grupo E.....	<b>53</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de Adenosina
AMP	Monofosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CK	Creatinoquinase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
I/R	Isquemia seguida por reperfusão
IL	Interleucina
MDO	Malondialdeído
Mg/dl	Miligrama por decilitro
Mg/Kg	Miligrama por quilograma
NO	Óxido Nítrico
PMN	Polimorfonucleares
PoCI	Pós condicionamento isquêmico
PrCI	Pré condicionamento isquêmico
PRX	Peroxirredoxinas
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
SOD	Superóxido Dismutase
XO	Xantina oxidase
µl	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
2.1 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	13
2.1.1 Isquemia e hipóxia.....	15
2.1.2 Reperusão.....	17
2.1.3 Formação de espécies reativas de oxigênio na isquemia e reperusão.....	18
2.1.4 Toxicidade das espécies reativas formadas na reperusão.....	21
2.1.5 Mecanismos antioxidantes.....	22
2.1.6 Estresse oxidativo.....	23
2.1.7 Alopurinol.....	24
2.1.8 Pós condicionamento isquêmico.....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 ANIMAIS.....	28
4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	28
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.4 CÁLCULO DO N AMOSTRAL.....	30
4.5 ANESTESIA.....	31
4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	31
4.6.1 Ureia.....	32
4.6.2 Creatinina.....	32
4.6.3 Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) .....	33
4.6.4 Creatina quinase (CK) .....	34
4.6.5 Lactato.....	34
4.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	35
4.8 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	35
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>8. ANEXOS</b> .....	66
8.1 ANEXO A - PROCESSO CEUA 038/2014.....	66
8.2 ANEXO B – PROCESSO CEUA 029/2015.....	67
8.3 ANEXO C – PLANILHAS HISTOLÓGICAS.....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A Isquemia é definida como a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial de um tecido, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose (PINHEIRO *et al.*, 1999). Reperusão é o termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia.

A reperusão, passo lógico para lidar com qualquer situação de isquemia, é considerada como um fator importante na deterioração do quadro de lesão local e sistêmico. Contraditoriamente, é a grande responsável pelas principais lesões nas células do órgão isquemiado e pode agravar o dano celular isquêmico, levando paradoxalmente a complicações sistêmicas como a síndrome da angústia respiratória do adulto, disfunções renais, hepáticas e ocasionalmente, até ao cenário sombrio da síndrome de disfunção sistêmica de múltiplos órgãos (FERRO *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2004).

Estas complicações em órgãos distantes àqueles que sofreram a isquemia e reperusão ocorrem devido aos diferentes mediadores liberados na circulação sanguínea sistêmica tais como leucócitos, citocinas pró-inflamatórias, adesinas e as espécies reativas de oxigênio (ERO) (CIZ *et al.*, 2001).

EROs são substâncias que apresentam um elétron não emparelhado em seu orbital externo, o que gera forte carga destrutiva de diversos componentes celulares, principalmente quando produzidos em excesso, ou quando suplantam mecanismos orgânicos de defesa (THOMPSON *et al.*, 1998). A cadeia respiratória produz estes radicais em consequência de processos metabólicos normais, mas na vigência de um estresse oxidativo, a exemplo dos processos de isquemia e reperusão (I/R) ou inflamatórios, há explosão de síntese destas espécies reativas do oxigênio. A isquemia cria condições para que, no momento da reperusão, enzimas ativadas participem da redução do oxigênio molecular gerando oxirradicais que podem levar a modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA (FERRO *et al.*, 2010). Além disso, podem inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também podem iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALIWELL *et al.*, 1986).

Pesquisas clínicas e experimentais, embasadas nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, tem proposto a utilização de diferentes substâncias com a finalidade de evitar ou minimizar os efeitos deletérios secundários a I/R, em sua maioria utilizando ratos, sendo que a maioria não apresentou resultados satisfatórios a ponto de permitirem seu emprego na prática clínica. Alguns, entretanto, apresentaram resultados promissores. (GOMES., 2007; SANTOS *et al.*, 2006; BITU-MORENO *et al.*, 2002). Nestas condições é reconhecida a importância da enzima xantina-oxidase na gênese destas ERO. Portanto, o alopurinol tem o potencial terapêutico para a redução dos danos celulares secundários à isquemia seguida de reperfusão e por consequência, as suas repercussões. (GOMES *et al.*, 2014)

Outras técnicas como o pós-condicionamento isquêmico (PoCI), que consiste em alguns ciclos de isquemia e reperfusão intercalados após o período de isquemia principal, foram aplicados com excelência em órgãos como o intestino, miocárdio e fígado. Os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores do condicionamento isquêmico contra a I/R são complexos e não são ainda totalmente conhecidos. (PINHEIRO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010)

A isquemia seguida de reperfusão é uma estratégia utilizada em cirurgias reconstrutivas vasculares para a contenção do sangramento e para re-estabelecimento do fluxo em extremidades isquêmicas, a qual pode contribuir em determinadas condições, para a ocorrência de complicações pós-operatórias. O objetivo deste estudo foi empregar as abordagens do pós condicionamento isquêmico e do tratamento com alopurinol na tentativa de reduzir as lesões de isquemia/reperfusão.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A isquemia é um dos problemas mais frequentes e desafiadores com que os cirurgiões vasculares se defrontam e é, ao mesmo tempo, paradoxal, pois, ao restabelecer o fluxo sanguíneo para um tecido ou órgão, podem ser desencadeadas lesões e alterações sistêmicas e/ou locais ainda mais intensas e graves que a isquemia *per se*. A lesão por isquemia-reperfusão é definida como uma série de eventos celulares resultantes da obstrução do fluxo sanguíneo e subsequente falta de oxigênio e nutrientes para as células, e que são capazes de promoverem dano orgânico (KUMAR *et al.*, 2005). Os distúrbios metabólicos durante isquemia ou hipóxia tissular são muito bem estabelecidos, porém evidências clínicas experimentais demonstram que os principais eventos que levam a disfunções celulares e teciduais relacionam-se com a subsequente reperfusão (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2016).

O processo de isquemia e hipóxia se inicia com a oclusão de uma artéria ou enxerto. Quando este processo se desenvolve lenta e progressivamente, da estenose hemodinamicamente significativa, até chegar a uma oclusão total, há tempo e possibilidade de desenvolvimento de circulação colateral que pode eventualmente evoluir para compensação da isquemia, pelo menos em parte. Esta é a situação que costuma ocorrer, por exemplo, com a oclusão trombótica arterial sobre uma lesão prévia. Por outro lado, quando a oclusão arterial se faz de forma abrupta, como acontece na embolia arterial, desencadeia de imediato intenso vaso espasmo distal, seguido de trombose secundária proximal e distal que, em função da estase e perda da função endotelial, se estende e oclui a circulação colateral, agravando a isquemia (SILVEIRA *et al.*, 2004). Nesse caso, a hipóxia tecidual em geral é mais grave, culminando com alterações teciduais importantes e intensas repercussões clínicas (MAFFEI *et al.*, 2002).

A intensidade da isquemia dependerá do nível da oclusão, da circulação colateral e do grau de demanda de oxigênio dos tecidos envolvidos. Nesse sentido, o tempo de isquemia é um fator crucial na determinação da intensidade das lesões e na viabilidade do membro (HAIMOVICCI *et al.*, 1985). Alguns tecidos como os

nervos periféricos e músculos, seriam menos resistentes à hipóxia em comparação com a pele (PERRY., 1991). Embora o músculo esquelético tenha taxa de metabolismo relativamente variável, quando comparado com outros tecidos (cérebro, miocárdio e rim), é o maior componente da extremidade inferior, atingindo mais de 90% da atividade metabólica (RUDERMAN *et al.*, 1977; RULEIN *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1990). No início do período de isquemia, as alterações bioquímicas das funções celulares básicas são reversíveis, no entanto, quando essa isquemia se prolonga, outra sequência de reações ocorre como consequência da falência energética da célula (QUINONES *et al.*, 1991).

Quando a tensão de oxigênio diminui, perde-se a fosforilação oxidativa e ocorre diminuição na geração de ATP. Tal fato promove falha no funcionamento das bombas de sódio e potássio, havendo perda de potássio e influxo de sódio e água para o interior da célula, gerando edema celular (KUMAR *et al.*, 2005). Em até 2 horas de isquemia, o metabolismo anaeróbio prevalece, levando ao aumento do lactato e fosfato inorgânico e à redução do pH, do trifosfato de adenosina (ATP) e da creatina em 40% do normal. Após 3 horas de isquemia, os níveis de ATP reduzem-se drasticamente e há piora da acidose. Acredita-se que a reperfusão feita até esse período (em até 3 horas de isquemia) seja capaz de restabelecer os níveis de ATP, sem gerar lesões teciduais (MORIN *et al.*, 2001). O intervalo de tempo para que esgotem os estoques de ATP é impreciso, mas está demonstrado que períodos de isquemia superiores a 5 horas, geralmente, produzem lesões irreversíveis (FERRARI, 2001). Na prática clínica, onde além do fator tempo, leva-se em consideração os fatores associados a viabilidade do território a ser revascularizado: mobilidade, sensibilidade, cor, temperatura e ausência de infarto dos tecidos, relata-se o sucesso da revascularização de extremidades até 6 a 8 horas de oclusão arterial aguda (FURLANI *et al.*, 2010; BLAISDELL *et al.*, 1978).

Para reverter o estado isquêmico, há necessidade de restauração de fluxo sanguíneo. Em 1911, Labey realizou com sucesso a primeira embolectomia direta em um doente com obstrução arterial aguda (OAA). Devido a este tipo de cirurgia, começaram a surgir complicações até então inexistentes (BEYERSDORF *et al.*, 1989). Algumas dessas pareciam ser dependentes da revascularização, ou seja, ocorriam com a súbita reperfusão de músculos isquêmicos e incluíam o aparecimento de edema tenso, estase capilar, hemorragia, exsudato inflamatório



agudo e mioglobinemia. Descreveu-se um fenômeno, hoje conhecido como fenômeno de não-refluxo (*no-reflow phenomenon*), em que áreas do músculo pós-reperfusão permaneciam, inexplicavelmente, sem perfusão (BITU-MORENO *et al.*, 2002).

A partir dos estudos de Granger e colaboradores em 1986, descobriu-se que o afluxo de oxigênio no tecido isquêmico levaria a uma série de alterações bioquímicas, inflamatórias e celulares mediadas principalmente pela formação dos radicais livres de oxigênio.

### 2.1.1 Isquemia e hipóxia

Quando a tensão de oxigênio dentro das células diminui, ocorre interrupção de fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, cessa a geração de ATP. As reservas são rapidamente consumidas (HACKEL *et al.*, 1988), e para manter sua atividade, a célula passa a fazer glicólise anaeróbica, gerando três moléculas de ATP por unidade glicosil de glicogênio (revertida em lactato), o qual é rapidamente depletado (REIMER *et al.*, 1983). O ATP pode ser gerado, também anaerobicamente, a partir do fosfato de creatina, pela ação da enzima creatinaquinase. O declínio nos níveis de ATP acelera após três horas de isquemia, com virtual exaustão das reservas de fosfocreatina (HARRIS, *et al.*, 1980). A vias anaeróbicas mantêm as bombas iônicas, o potencial de membrana e a função contrátil, apesar da produção de ácido láctico que se difunde para o interstício causando edema e acidemia (YOSHIDA, 1996).

Com o esgotamento dessa fonte energética, há falência das bombas e, conseqüentemente, o gradiente iônico das células altera-se com saída de potássio e magnésio e entrada de sódio e cálcio para o meio intracelular, causando edema celular, da matriz e das cristas mitocondriais (MORIN *et al.*, 2001; YOSHIDA., 1996). Até este ponto, as lesões ainda são reversíveis com a reperfusão (PICCINATO, 1991).

Persistindo a isquemia, o trombo arterial tende a se propagar, ocluindo as saídas e entradas da rede colateral. Além disso, o edema tecidual acaba comprimindo os vasos dentro dos tecidos e as próprias células dos vasos

edemaciam, estreitando a luz vascular de arteríolas, capilares e vênulas (OURIEL, 2000). Simultaneamente ocorre uma perda progressiva de glicogênio e redução na produção de proteínas. O citoesqueleto se dispersa e há formação de numerosas bolhas (*blebs*) na superfície celular, além da formação de figuras de mielina, resultado da dissociação de lipoproteínas com exposição dos grupos fosfolipídicos e retenção de água entre os folhetos lamelares das membranas. A esta altura, as membranas já se encontram edemaciadas pela perda de controle do seu volume, dilatação do retículo endoplasmático e edema celular com aumento na quantidade de água, sódio e cloreto e diminuição nos níveis de potássio. Se a isquemia persistir a lesão torna-se irreversível e haverá necrose tecidual (KUMAR *et al.*, 2005). Ocorre vacuolização das mitocôndrias, alterações nas membranas plasmáticas e ingurgitamento dos lisossomos (MORENO,1991; KUMAR *et al.*, 2005). A maior oferta de cálcio intracelular ativa proteases citoplasmáticas (calpaína) que combinadas com a grande concentração de hipoxantina, resultante da degradação ininterrupta do ATP, convertem a enzima xantina desidrogenase para a forma oxidase, que como se verá adiante, tem importância nas lesões de reperfusão. O cálcio ativa também as enzimas lisossômicas, que lesam diretamente as organelas digerindo os componentes celulares progressivamente até causar a morte celular. A enzima fosfolipase A2, que degrada o ácido araquidônico também é ativada dando origem a mediadores da inflamação: leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (FERRO *et al.*, 2010).

O leucotrieno B4, gerado pela via lipooxigenase, liga-se a receptores específicos na superfície dos neutrófilos o que leva à sua adesão e ativação, por meio do complexo CD11/CD18. Os leucócitos, ainda liberam enzimas proteolíticas, radicais livres e outros produtos tóxicos, piorando as condições locais. As enzimas proteolíticas dos leucócitos destroem o ácido hialurônico e rompem as membranas basais, aumentando a permeabilidade capilar e o edema intersticial (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). O aumento do fluido intersticial e do volume celular pode aumentar a resistência vascular e, em associação com o aumento da viscosidade sanguínea, concorre para o estabelecimento de uma barreira adicional à restauração da perfusão tecidual normal (YOSHIDA *et al.*, 1998), dificultando a reperfusão, seja por empilhamento de células sanguíneas vermelhas em capilares estreitados por edema endotelial, seja pelo tampão (*plugging*) de neutrófilos

(WELBOURN *et al.*, 1991). De outro lado, os leucotrienos C4 e D4 causam vasoconstrição, piorando a perfusão. A via ciclooxigenase produz prostaciclina (PGI-2) no endotélio e possui ação antiagregante plaquetária e vasodilatadora. Nas plaquetas, é produzido em grande quantidade o tromboxano A2, potente vasoconstritor, agregador e ativador das plaquetas e dos neutrófilos, comprometendo a microcirculação. Não obstante, dos efeitos antagônicos de alguns dos mediadores endoteliais e teciduais, prevalecem na isquemia: a vasoconstrição, a lesão endotelial, a agregação plaquetária, a quimiotaxia e a ativação de neutrófilos (MORIN *et al.*, 2001; YOSHIDA., 1996).

A reversibilidade deste processo relaciona-se diretamente com o tempo de isquemia, de modo que o objetivo terapêutico principal é restabelecer a perfusão o mais rápido possível (TAKHTFOOLADI *et al.*, 2016; STHAL *et al.*, 1980).

### 2.1.2 Reperusão

Foi Haimovici, em 1960, quem sistematizou e caracterizou as complicações decorrentes da reperusão como uma síndrome, denominando-a síndrome metabólica mionefropática, hoje também conhecida como síndrome de reperusão, síndrome do torniquete ou síndrome pós-isquêmica (HAIMOVICI *et al.*, 1960).

Evidências sugeriram que a reintrodução do oxigênio molecular nos músculos isquêmicos como o principal agente lesivo da reperusão. Através de experimentos com alguns músculos esqueléticos de cães, foi descrita uma alteração da diferença de potencial transmembrana, que guardava proporção direta com o tempo da reperusão (ROBERTS *et al.*, 1985). Posteriormente, administraram imediatamente antes da reperusão, superóxido dismutase (SOD), uma enzima removedora do radical superóxido, e observaram que a mesma prevenia a deterioração progressiva da diferença do potencial transmembrana (PERRY *et al.*, 1985).

Culturas do endotélio da artéria pulmonar de ratos foram submetidas a anoxia, seguida por reintrodução de oxigênio. No grupo controle, sem restrição de oxigênio, as células permaneceram viáveis durante todo o experimento. O processo de anoxia seguido por reoxigenação produziu lesão celular em  $71\% \pm 6\%$  das células. Também foi adicionado SOD e catalase às culturas. Os resultados

demonstraram serem elas eficientes na atenuação de lesões da anoxia-reoxigenação. E por serem igualmente efetivas, tanto antes da anoxia quanto antes da reoxigenação, conclui-se que as lesões ocorriam, primariamente, por ocasião da reperfusão, mediadas por um processo dependente de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BITU-MORENO *et al.*, 2002; RATYCH *et al.*, 1987).

Foi demonstrada a presença de produtos de peroxidação lipídica em baixos níveis em músculos esqueléticos de cães, por ocasião da isquemia. Um pequeno – embora significativo – aumento foi observado ao final da isquemia e, por ocasião da reperfusão, um grande e substancial aumento foi relatado. Sabendo-se que os radicais livres, agindo sobre os lipídios, provocam a formação desses produtos, e que as membranas celulares possuem lipídios como constituintes fundamentais de sua estrutura, os autores sugeriram que os ERO agiriam primariamente nos lipídios das membranas, lesando as células (LINDSAY *et al.*, 1988).

Quando ocorre o restabelecimento no suprimento de oxigênio, os metabólitos tóxicos são removidos. No entanto o retorno de sangue rico em potássio e com pH ácido para a circulação sistêmica provoca efeitos metabólicos em todo o organismo (MIRANDA *et al.*, 2004). Danos locais e sistêmicos da isquemia-reperfusão são associados diretamente a uma alta concentração de neutrófilos na microvasculatura. Tal interação neutrofílica e endotelial provoca disfunção celular e destruição tissular, através de diversos mecanismos citotóxicos. Os neutrófilos são capazes de promover a oclusão de capilares e arteríolas e liberação de diversas substâncias como radicais livres de oxigênio, enzimas citotóxicas e citocinas. Muitas dessas substâncias atraem leucócitos adicionais e aumentam fixação dos neutrófilos ao endotélio vascular. Com o agravamento da lesão, os neutrófilos infiltram-se nos tecidos, enzimas e radicais livres são produzidos e amplificam a lesão tecidual (EVORA *et al.*, 1996).

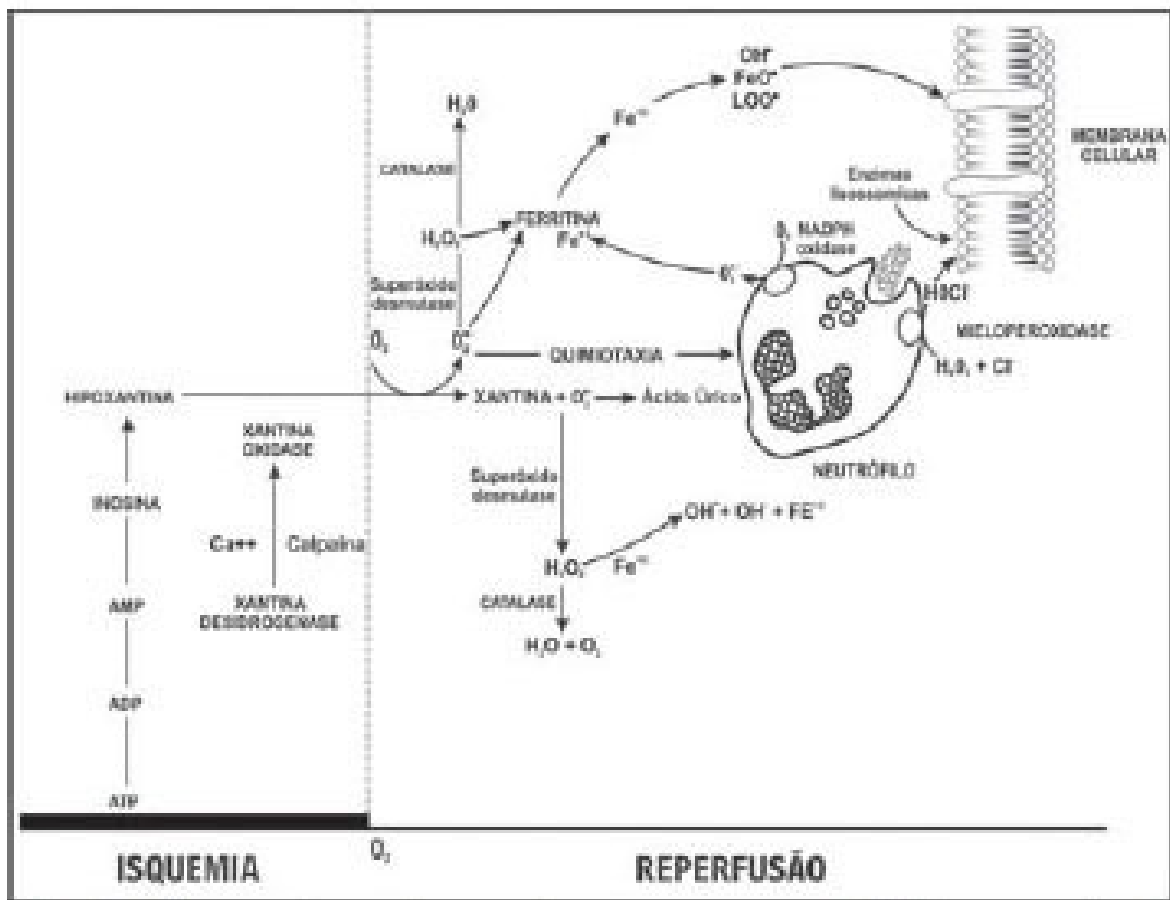
### 2.1.3 Formação das espécies reativas de oxigênio na isquemia e reperfusão

A falta de ATP acarreta falência das bombas transmembrana e alterações no gradiente iônico das células, com afluxo de sódio e cálcio para o meio intracelular com a formação de edema celular. Além disso ativa-se a fosfolipase A2 e a calpaína

entre outras proteases citoplasmáticas. Ocorre liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), que lesam diretamente organelas celulares, culminando com a morte celular (FERRO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 1997). A fosfolipase A2 libera o ácido araquidônico, que dará origem a mediadores da inflamação, como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos. A ação destas substâncias desencadeia adesão e ativação neutrofílica, vasoconstrição, lesão tecidual, agregação plaquetária e quimiotaxia na área isquêmica (SILVEIRA *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2001).

A calpaína é uma protease cálcio dependente, que durante a isquemia, transforma a xantina desidrogenase, gerada pelo metabolismo anaeróbico, em xantina oxidase. A enzima xantina oxidase constitui uma importante fonte de radicais livres durante o processo de reperfusão (FIGURA 1).

**FIGURA 1:** Eventos bioquímicos da isquemia – reperfusão em um fagócito: Durante a isquemia o ATP é degradado à hipoxantina e a xantina desidrogenase é convertida a sua forma oxidase. Na reperfusão, há a reintrodução do O<sub>2</sub> molecular, e em uma sequência de sucessivas reações de oxidorredução, novos oxirradicais são formados.



**FONTE:** adaptado de FRANCISCHETTI *et al.*, 2010.

No decorrer da isquemia, a xantina oxidase se deposita nos tecidos (NAUTA *et al.*, 1990). Na reperfusion, o oxigênio, ao passar na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, capta um elétron com a participação da nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenase (NADH). A partir de então, em uma sequência de sucessivas reações de oxidorredução, cedendo um elétron livre ou recebendo um elétron livre, novos oxirradicais são formados. O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todas as espécies reativas do oxigênio são radicais livres, e estes nem sempre são oxidantes (MAIA, 2006). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (FERRO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007).

Em situações fisiológicas, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) é o receptor final de elétrons na cadeia respiratória, que tem a participação da enzima xantina desidrogenase catalisando essa reação, cujo produto final é a

água. Nos tecidos pós-isquêmicos (na reperfusão), há o acúmulo da xantina oxidase que, ao invés do NADPH, utiliza o  $O_2$  disponibilizado pela reperfusão como acceptor final de elétrons.

Durante esse processo também há acúmulo de hipoxantina. A enzima que realiza a conversão de hipoxantina à xantina utiliza oxigênio gerando o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Esse radical, espontaneamente ou por ação enzimática (reação com a superóxido dismutase-SOD), sofre dismutação em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esse íon promove liberação de ferro, de modo que grande quantidade se encontra disponível na catalisação da conversão de peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (NAUTA *et al.*, 1990). Na presença de certos metais de transição ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{1+}$ ,  $Co^{2+}$ ) o  $OH^{\bullet}$  pode ser formado muito mais rapidamente, pela equação descrita por Fenton (FRANSCICHETTI *et al.*, 2010).

A formação de radicais livres também pode ser explicada pela grande diminuição dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. No momento da reperfusão, há produção do ânion superóxido, devido ao aumento da taxa de oxidação de flavina semiquinona e ubi semiquinona e NADH desidrogenase. O aumento da concentração das semiquinonas é devido a inibição da transferência de elétrons na cadeia respiratória (NAUTA *et al.*, 1990).

Outras vias de produção de ERO conhecidas são a autooxidação de catecolaminas e a enzima NADPH-oxidase neutrofílica. Os neutrófilos ativados geram ERO nos vacúolos fagocitários, pela ativação da oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPHoxidase), que converte o  $O_2$  em ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), seguindo-se a cadeia de eventos até a formação do radical  $OH^{\bullet}$ . A mieloperoxidase presente nos leucócitos catalisa a reação do  $H_2O_2$  com o cloro, formando hipoclorito, potente agente oxidante (FRANSCICHETTI *et al.*, 2010).

As ERO e produtos da reação inflamatória funcionam como quimiotáticos, atraindo e ativando os leucócitos, os quais liberam várias enzimas proteolíticas, como elastases, hidrolases, mieloperoxidases e proteases, causando destruição tecidual e amplificando a resposta inflamatória e a quimiotaxia (MITCHEL *et al.*, 2006)

#### 2.1.4 Toxicidade das espécies reativas de oxigênio formadas na reperfusão

O radical hidroxila apresenta aspecto de grande importância representado pela ação iniciadora das lesões, desde que é capaz de reagir com a maioria das moléculas biológicas (HALLIWEL *et al.*, 1989).

As lesões causadas pelo  $\text{OH}\cdot$  são localmente circunscritas, embora possam determinar o aparecimento de radicais secundários produzidos durante a sua ação, os quais poderão se difundir no meio intracelular ou mesmo no espaço extracelular, sendo assim danosos em sítios distantes de seu local de origem.

Os principais alvos de ataques dos radicais livres nas células são as proteínas, o ADN e os lipídeos.

Quanto às proteínas, as modificações observadas causadas pelos radicais livres na estrutura da molécula proteica podem contribuir na gênese de processos patológicos de duas maneiras: pela modificação da estrutura de enzimas o que acarreta alteração na função enzimática ou pela modificação estrutural de proteínas que desempenham importante papel na arquitetura celular (STADMAN *et al.*, 1991).

Quanto ao ADN, os radicais livres são responsáveis por modificações nas bases nitrogenadas, levando assim a mutagênese e carcinogênese. Os radicais livres podem interagir com as bases purínicas e pirimidínicas ou com a desoxirribose (SARAFIAN *et al.*, 1994).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. (GARDES-ALBERT *et al.*, 1991).

A reação inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}\cdot$  ou pelo  $\text{LO}\cdot$  (radical alcóxila), com conseqüente formação do  $\text{L}\cdot$  (radical lipídico). Na equação de propagação, o  $\text{L}\cdot$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}\cdot$  (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o  $\text{L}\cdot$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}\cdot$  e  $\text{LOO}\cdot$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios. A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos ( $\text{LOOH}$ ) em radicais altamente reativos (alcóxila,  $\text{LO}\cdot$  e peróxila,  $\text{LOO}\cdot$ ), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. (BORG *et al.*, 1988).



A reação em cadeia prossegue e os peróxidos de lipídios acumulam-se na membrana. Peróxidos lipídicos desestabilizam as membranas e as tornam permeáveis aos íons. Radicais peroxil podem atacar além dos lipídeos, as proteínas da membrana, alterando enzimas, receptores e sistemas de transdução, e além disso oxidar o colesterol, aumentando a produção de LDL oxidada. (HALLIWEL; *et al.*, 1989).

### 2.1.5 Mecanismos antioxidantes

Diversos mecanismos de defesa antioxidante são encontrados em nosso organismo. Tais mecanismos buscam limitar os níveis intracelulares dos radicais livres, impedindo a indução de danos. Os agentes responsáveis por este processo de proteção, são denominados antioxidantes e segundo Halliwell e Gutteridge (1999), podem ser definidos como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente, a oxidação daquele substrato.

Os antioxidantes são capazes de atuarem em níveis distintos. O primeiro mecanismo de defesa tem como objetivo impedir a produção dos radicais livres, principalmente através da inibição de reações em cadeia com o cobre e o ferro. O segundo mecanismo de proteção diz respeito à interceptação dos radicais livres gerados através de fontes endógenas ou metabolismo celular, impossibilitando o ataque a lipídios da membrana, aminoácidos que compõem as proteínas, ligação dupla dos ácidos graxos insaturados e as bases do DNA. Esse último mecanismo de proteção é realizado por antioxidantes obtidos da dieta, tais como flavonoides, carotenoides e vitaminas C, E e A (BIANCHI *et al.*, 1999).

É possível haver também reparo das lesões geradas pelos radicais livres. Tal processo apresenta-se relacionado à remoção dos danos causados na molécula de DNA e reconstituição das membranas celulares que foram alvo de danos (BIANCHI *et al.*, 1999).

Existem dois sistemas de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos.

Os antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes endógenos. Eles neutralizam as espécies reativas de oxigênio (EROs) excessivas e previnem danos da estrutura celular. São compostos pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CTL), peroxirredoxinas (Prx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx) (ANDRADE *et al.*, 2010).

Os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes suplementados na dieta. Fazem parte do sistema não enzimático, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido  $\alpha$ -lipoico (NORDBERG *et al.*, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, betacaroteno e caroteno (MAIA, 2006).

Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular (FERREIRA *et al.*, 1997).

#### 2.1.6 Estresse oxidativo

A formação de radicais livres e as defesas antioxidantes encontram-se em aproximado estado de equilíbrio, portanto, o estresse oxidativo está relacionado com o aumento na produção de EROs e redução nos níveis de antioxidante (HIMMELFARB *et al.*, 2004), ou seja, é a quebra do equilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidantes, seja por aumento do primeiro, seja por diminuição do segundo.

O estresse oxidativo e a produção de seus radicais é decorrente de dois eventos fisiopatológicos principais: a isquemia seguida de reperfusão e os processos inflamatórios. O estresse pode causar alterações locais e/ou sistêmicas, principalmente pela liberação de substâncias citotóxicas (radicais livres derivados do oxigênio entre outras), oriundas da cadeia respiratória, ou de neutrófilos polimorfonucleares e de células endoteliais (CIZ *et al.*, 2001).

A cadeia respiratória produz ERO em consequência de processos metabólicos normais. Mas, na vigência de um estresse oxidativo, a exemplo dos processos de isquemia e reperfusão (I/R) ou inflamatórios, há explosão de síntese

destas espécies reativas do oxigênio. A isquemia cria condições para que, no momento da reperfusão, enzimas ativadas participem da redução do oxigênio molecular gerando oxirradicais. Os radicais livres derivados do oxigênio apesar de agirem contra microrganismos agressores, também causam lesões celulares graves, se produzidos em grandes quantidades em face da manutenção do agente causal. Apesar do potencial destrutivo dos ERO, as células têm mecanismos de defesa que bloqueiam ou limitam a ação destes e que incluem sistemas enzimáticos intracelulares, denominados como inativadores, bloqueadores ou varredores. Uma produção excessiva destes radicais, oriunda de processo patológico persistente, pode suplantar tais mecanismos e causar lesão tecidual direta, peroxidação lipídica das membranas celulares, carbonilação das proteínas, citoesqueletólise e alterações do DNA. (FERRO *et al.*, 2010)

Este modelo está presente em situações clínicas variadas onde se impõem períodos de isquemia seguidos por reperfusão, como choque hipovolêmico, sepse, oclusões arteriais agudas, cirurgias reconstrutivas, e grandes traumas em geral.

### 2.1.7 Alopurinol

Com a reperfusão, a hipoxantina acumulada é oxidada em xantina pela xantina oxidase (XO) e a xantina é transformada em ácido úrico. Nessa reação a XO transfere elétrons para o oxigênio molecular, gerando radicais livres instáveis: radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ). Logo a ação da XO gera radicais livres do oxigênio nos tecidos reperfundidos, potenciais causadores da lesão I/R (GOMES *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2005)

O alopurinol é um inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese de ácido úrico. Sua ação como protetor tecidual da lesão I/R tem sido demonstrada experimentalmente.(ANDRADE *et al.*, 2001; FORMIGLI *et al.*, 1997) O alopurinol e seu metabólito principal, a aloxantina, são inibidores competitivos e não competitivos, respectivamente, da enzima xantina-oxidase, sendo esta inibição seu principal efeito farmacológico. A aloxantina possui uma permanência longa nos tecidos e é, indubitavelmente, responsável pela maior parte da atividade farmacológica da droga (RHODERN,1998; ZAGER *et al.*, 1989), o que leva a uma

menor produção do radical superóxido. Além disso, a aloxantina ou oxipurinol, mostrou-se um potente “neutralizador” do radical hidroxila, maior responsável pela peroxidação lipídica da membrana celular (SILVA *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2005; FERRO *et al.*, 2010).

Os efeitos mais pronunciados do alopurinol residem, portanto, na sua capacidade de inibir a geração de espécies ativas do oxigênio, no período reperfusional, tendo em vista ser a enzima xantina-oxidase aceptora de elétrons e, portanto, capaz de formar o radical superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio (GREENE *et al.*, 1992).

#### 2.1.8. Pós condicionamento isquêmico

Em 1986, duas publicações trouxeram um grande avanço para o tratamento da síndrome de isquemia e reperfusão. A primeira delas foi a de Parks e Granger (GRANGER *et al.*, 1986), demonstrando que a reperfusão é mais lesiva do que a isquemia isoladamente, promovendo uma grande mudança nos conceitos vigentes e dando início a inúmeros estudos que vieram elucidar a fisiopatologia da isquemia e reperfusão. A segunda publicação de grande importância foi a de Murry (MURRY *et al.* 1986), que trouxe o conceito do pré condicionamento isquêmico (PrCI) como forma de minimizar as lesões de isquemia e reperfusão. Estes autores descreveram o efeito benéfico de curtos períodos de oclusão coronária seguidos também por curtos períodos de reperfusão, antes de se iniciar a fase de isquemia propriamente dita, observando redução na lesão miocárdica isquêmica em cães.

Entretanto, existem situações em que a isquemia é identificada já quando as lesões estão instaladas, não havendo oportunidade para emprego do pré condicionamento.

Em 2003, foi apresentado o conceito do pós-condicionamento isquêmico (PCI), que consiste na realização de um ou mais ciclos curtos de reperfusão seguidos por um ou mais ciclos curtos de isquemia, imediatamente após a fase de isquemia e antes de se dar a reperfusão permanente. Estes autores demonstraram que o PCI foi tão eficaz quanto o PrCI na prevenção das lesões de reperfusão,

demonstrando experimentalmente em cães que o pós-condicionamento isquêmico reduzia a área com infarto do miocárdio. (ZHAO *et al.*, 2003; WEVER *et al.*, 2011)

Este estudo levou a outros trabalhos que de forma semelhante têm demonstrado a capacidade do PoCI de prevenir as lesões de isquemia e reperfusão, tanto quanto o PrCI (SCHIPKE *et al.*, 2006). Estudos subsequentes confirmaram a presença do mesmo comportamento em outros modelos com miocárdio de animais *in vivo* (coelhos (YANG *et al.*, 2004), ratos (KIN *et al.*, 2004)) e *ex vivo* (coelhos (YANG *et al.*, 2005), ratos (TSANG *et al.*, 2005), camundongos (HEUSH *et al.*, 2006).

Neste trabalho procuramos analisar os efeitos sistêmicos e à distância do foco de isquemia, diferentemente do modelo usual adotado de isquemia, com estudo das alterações no segmento isquemiado. Se confirmada a eficácia do PCi em ratos, este poderá ser um grande avanço no tratamento da isquemia e reperfusão, uma vez que é muito frequente fazer-se o diagnóstico das lesões deste processo quando a isquemia já ocorreu e, então, não haveria espaço para utilização do PrCI.

### 3. OBJETIVOS

Estudar os efeitos do antioxidante alopurinol e do pós condicionamento isquêmico, sobre as consequências deletérias da isquemia seguida de reperfusão em um modelo de isquemia padronizado em membros caudais de ratos

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de pós-condicionamento em ratos Wistar após isquemia da artéria aorta infra-renal;

- Em ratos submetidos a isquemia seguida de reperfusão, tratados ou não com alopurinol e/ou pós condicionamento isquêmico foram analisados os seguintes parâmetros:

1. Capacidade antioxidante total do soro;
2. Ureia, creatinina, creatinofosfoquinase total, lactato, transaminase oxalacética e transaminase pirúvica no soro;
3. Alterações histológicas no intestino delgado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 35 ratos da linhagem Wistar, fêmeas (DIDONÉ *et al.*, 2002), com aproximadamente 3 meses e peso variando de 250 a 300 g provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Ponta. Os animais foram mantidos no biotério da UEPG, com seis animais por gaiola, com água e alimento a vontade, que eram trocados diariamente. Durante os procedimentos cirúrgicos os animais foram encaminhados para o Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental ou laboratório multidisciplinar, bloco M, UEPG.

Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPG, sob o número 38/2014 e 29/2015.

### 4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após anestesia, os animais foram submetidos a tricotomia ampla do abdome, fixados em decúbito dorsal e submetidos a antissepsia com álcool iodado. Foi então procedida uma laparotomia por incisão mediana xifopúbica com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal. As alças intestinais foram tracionadas para fora da cavidade peritoneal e protegidas com gazes esterilizadas umedecidas em solução salina isotônica. O peritônio parietal posterior foi dissecado e a veia cava separada da aorta infra-renal. Os grupos B, C, D e E sofreram oclusão aórtica por duas horas, com dupla laçada de *vessel loop*. Durante este período as alças intestinais foram recolhidas para a cavidade abdominal e umedecidas com gazes em solução salina isotônica estéril para evitar perda de líquido por evaporação. Após o período de isquemia, os clampes foram retirados e o fechamento da ferida cirúrgica foi feito por sutura contínua, em dois planos. O grupo A não sofreu processo de isquemia, foi feito apenas a dissecação da aorta infra-renal, manutenção por 2 horas (tempo médio para realização de cirurgia e

isquemia nos outros grupos) e fechamento da ferida cirúrgica. Os animais foram então encaminhados ao biotério e mantidos com água e alimentação a vontade.

Após 72 horas, os animais foram anestesiados com quetamina e xilasina (75 e 10 mg/kg, respectivamente). Foi realizada coleta de cerca de 5 ml sangue, sem heparina, por punção da artéria carótida com auxílio de dispositivo intravenoso do tipo cateter plástico sobre agulha (abocath). O animal foi sacrificado por exsanguinação e o abdome foi aberto para retirada do intestino delgado, que foi identificado e recebeu preparo para análise histológica.

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos, com a previsão inicial de se manter 7 animais por grupo.

- **Grupo A (Sham):** animais que não foram submetidos a isquemia. Foi procedida a laparotomia e dissecação da aorta abdominal infra-renal, seguido do fechamento 2 horas depois;
- **Grupo B (Isquemia/reperfusão única):** animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico com 2 horas de isquemia e retirada dos clampes para reperfusão apenas uma vez;
- **Grupo C (alopurinol/isquemia/reperfusão única):** animais receberam, por gavagem com sonda rígida, dose de 100 mg/kg de alopurinol, uma hora antes do procedimento cirúrgico, depois foram submetidos a 2 horas de isquemia e retirada dos clampes para reperfusão apenas uma vez;
- **Grupo D (isquemia/PCI):** animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, com 2 horas de isquemia e reperfusão. Entre a isquemia e a reperfusão foram realizados três ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de isquemia (dois minutos cada);

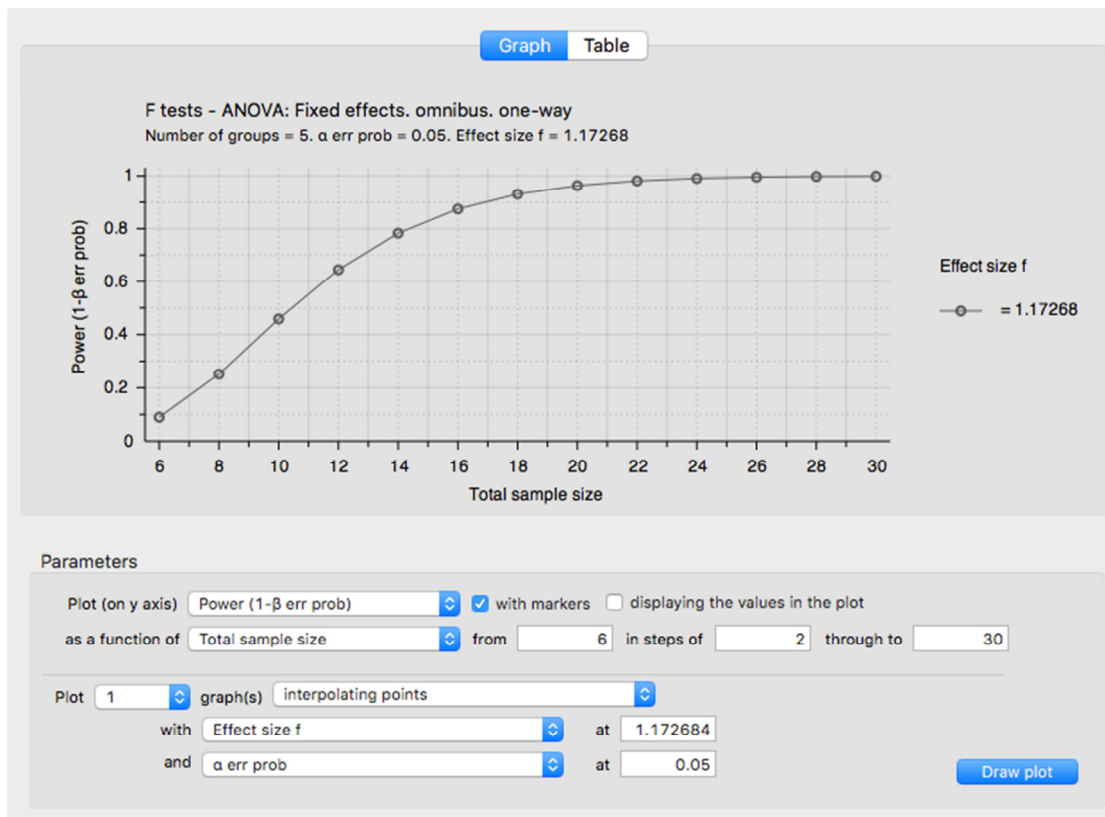


- **Grupo E (alopurinol/isquemia/PCI):** animais receberam, por gavagem com sonda rígida, dose de 100 mg/kg de alopurinol, uma hora antes do procedimento cirúrgico, depois foram submetidos a 2 horas de isquemia e reperfusão. Entre a isquemia e a reperfusão foram realizados três ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de isquemia (dois minutos cada);

#### 4.4 CÁLCULO DO N AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado com base em ensaios piloto com grupos contendo um N amostral de 3 animais, sendo adotado um nível de significância de  $\alpha=0,05$ , para os 5 grupos experimentais (Sham, reperfusão única, alopurinol/reperfusão única, PCI e Alopurinol/PCI). Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder do teste em 80%. Assim, o tamanho amostral foi estabelecido com base nas variáveis obtidas com a dosagem de lactato. Assim foi obtido com  $n=3$ /grupo (tamanho do efeito de 1,17) o poder do teste foi 83%. Desta forma, optamos por um tamanho amostral de 7 animais por grupo, considerando a possibilidade de redução do N durante os procedimentos (figura 2). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa GPower 3.1 (FAUL *et al.*, 2007).

**FIGURA 2.** Valores do poder do teste em relação ao tamanho amostral. Print screen de tela do programa GPower 3.1.



FONTE: O autor

#### 4.5 ANESTESIA

Os animais foram anestesiados com a associação de quetamina e xilasina, 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, administradas por via intraperitoneal. A manutenção da anestesia durante o procedimento cirúrgico foi realizada utilizando 1/2 ou 1/3 da primeira dose, por via intramuscular.

#### 4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

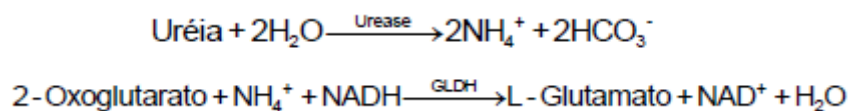
As amostras foram acondicionadas em tubos de 15 ml sem anticoagulante, deixadas em repouso por 10 minutos para permitir coagulação. Em seguida foram centrifugadas por 10 min à 3000 rpm. O soro foi coletado e armazenado em ultra

freezer à - 70°C, até o momento das análises. O mesmo foi dividido em 3 partes. Uma alíquota foi encaminhada ao laboratório escola da UEPG, para realização dos ensaios de ureia, creatinina, AST e ALT. Outra alíquota foi enviada ao laboratório de análises químicas LAPAC de Ponta Grossa para dosagem de CK e o lactato. A terceira alíquota foi utilizada para determinação da capacidade antioxidante total com a colaboração do grupo do professor José Carlos Velloso na UEPG.

#### 4.6.1 Ureia

A Ureia é o produto final nitrogenado proveniente do catabolismo das proteínas. Estados associados com elevados níveis de ureia no sangue são referidos a hiperuremia ou azotemia. (THOMAS, 1998) A ureia foi dosada através do kit Ureia UV (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado.

O princípio deste kit é a hidrólise da ureia à amônia pela urease. A amônia reage com 2-Cetoglutarato e NADH em reação catalisada pela glutamato desidrogenase promovendo a oxidação do NADH a NAD. A consequente redução da absorbância medida a 340nm é proporcional a concentração de ureia.

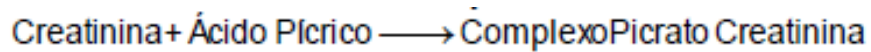


#### 4.6.2 Creatinina

A creatinina é um produto de degradação da creatina, excretada pelos rins, principalmente pela filtração glomerular. O aumento dos valores de creatinina no plasma sempre indica diminuição da excreção, ex. função renal prejudicada. (NEWMAN, 1999)

A creatinina foi dosada através do kit Creatinina (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. O método utilizado por este kit é cinético sem desproteinização de acordo com o método Jaffé. De

acordo com este método, a creatinina forma um complexo colorido laranja-avermelhado em uma solução picrato alcalino. A diferença de absorbância em tempo fixo durante a conversão é proporcional a concentração da Creatinina na amostra.



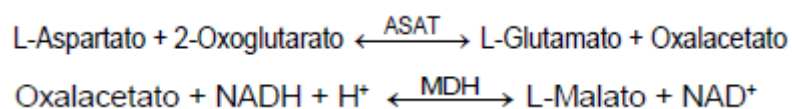
#### 4.6.3 Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

Alanina Aminotransferase (ALAT/ALT) formalmente chamada Transaminase Glutâmica Pirúvica e Aspartato Aminotransferase (ASAT/AST), formalmente chamada Transaminase Glutâmica Oxalacética são as mais importantes enzimas representativas do grupo de enzimas, de Aminotransferase ou Transaminase, o qual catalisa a conversão dos ácidos  $\alpha$ -ceto em amino pela transferência do grupo amino. Como a ALAT é uma enzima específica do fígado, ela somente é elevada significativamente em doenças hepatobiliares. Aumento dos níveis de ASAT, entretanto, pode ocorrer em conexão com danos no coração ou músculos esqueléticos bem como do parênquima hepático. A medição paralela da ALAT e ASAT é, portanto, aplicada para distinguir danos do fígado e coração e da musculatura esquelética (BERGMEYER, 1977).

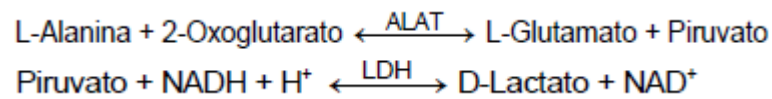
A AST e ALT foram dosadas através dos kits TGO (AST) e TGP (ALT), respectivamente (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. É um método UV otimizado de acordo com IFCC (Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial).

Princípio dos testes:

AST



## ALT

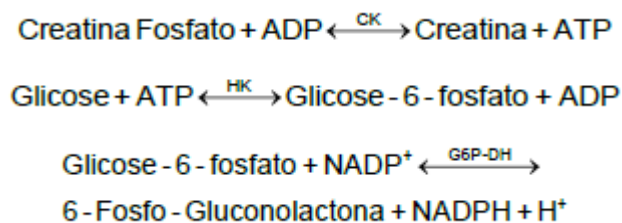


## 4.6.4 Creatina quinase (CK)

Creatina quinase (CK) é uma enzima que consiste de isoenzimas principalmente do músculo (CK-M) e o cérebro (CK-B). CK existe no soro na forma de dímero como CK-MM, CK-MB, CK-BB e como macroenzima. Valores elevados de CK são observados em danos ao músculo cardíaco e doenças do músculo esquelético (THOMASSIAN *et al.*, 2007).

A CK foi dosada através do kit CK-NAC (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. - Estados Unidos), no equipamento Advia® 1200. É um teste UV otimizado de acordo com DGKC (Sociedade Germânica de Química Clínica) e IFCC (Federação Internacional de Química Clínica).

Princípio do teste:

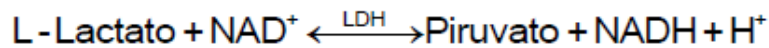


## 4.6.5 Lactato

Lactato é o produto final da glicólise anaeróbica e é utilizada como indicador para o estado de oxigenação em tecidos celulares. (DAVID *et al.*, 1999)

O lactato foi dosado através do kit Lactato (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. O método é UV enzimático utilizando Lactato Desidrogenase (LDH).

Princípio do teste:



#### 4.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A capacidade antioxidante total (CAT) foi mensurada através do método que se baseia no desaparecimento da cor característica de um radical catiônico mais estável, o 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS). O radical monocátion pré-formado de ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) é gerado pela oxidação com persulfato de potássio. A solução estoque de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com água deionizada até obter-se uma absorvância próxima de 0,70 em 734nm. Em seguida, a amostra (soro) foi adicionada ao ABTS oxidado e a absorvância medida novamente. Antioxidantes presentes na amostra capturam o radical cátion em um grau proporcional as suas concentrações. O resultado foi expresso como porcentagem de radical capturado.

#### 4.8 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Segmentos do intestino delgado de animais de todos os grupos foram coletados 72 horas após o procedimento cirúrgico e fixados em ALFAC (85% de etanol 80%, 5% de ácido acético glacial, 10% de formol) por 16 horas. Em seguida os tecidos foram desidratados em banhos consecutivos de etanol e diafanizados com xilol. Os tecidos foram então incluídos em parafina e cortados em micrótomo (secções de 5 micrômetros), acondicionados em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina. Todo o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histotécnica da UEPG, bloco M, laboratório 60.

Os cortes foram analisados, fotografados e classificados de acordo com grau de lesão tecidual segundo Chiu e colaboradores (1970), com todas as amostras sendo analisadas e classificadas independentemente por dois examinadores em separado e de modo cego:

- **Grau 0:** mucosa normal, sem alterações
- **Grau 1:** vilosidades bem constituídas, sem processo inflamatório, mas com formação de espaço subepitelial;
- **Grau 2:** formação de espaço subepitelial e espaçamento aumentado entre as vilosidades e presença de lise celular;
- **Grau 3:** destruição da porção livre das vilosidades, capilares dilatados e componente inflamatório
- **Grau 4:** destruição estrutural das vilosidades, material necrótico, componente inflamatório, hemorragia e ulceração glandular basal;
- **Grau 5:** destruição de toda a mucosa, ausência de estrutura glandular, apenas material amorfo sobre a camada submucosa.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M), para os ensaios bioquímicos, de capacidade antioxidante total. Os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, estas condições foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. A análise estatística foi realizada pela Análise de Variância de uma via (ANOVA de uma via ) seguida pelo teste post-hoc de Tukey ou Dunnett. O nível de significância aceito para os testes foi de  $P < 0,05$ . Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism (versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O clampeamento aórtico executado no reparo aberto de aneurismas da aorta e nas lesões vasculares periféricas está associado às alterações hemodinâmicas que acarretam lesão de Isquemia/Reperusão (I/R). Frequentemente presente em situações peri operatórias, os distúrbios metabólicos durante a isquemia tem importante papel na morbimortalidade hospitalar, porém evidências clínicas experimentais demonstram que os principais eventos que levam a disfunções celular e tecidual relacionam-se com a subsequente reperusão dos tecidos isquêmicos, que embora seja condição *sine qua non* para manter a viabilidade dos sistemas e manutenção da vida, produz o agravamento das lesões preexistentes, efeito paradoxal da reoxigenação que se deve às ações dos radicais livres de oxigênio (ROCHA *et al.*, 2012). Estes danos já foram estudados através de diversos modelos experimentais baseados em pinçamento do pedículo vascular mesentérico (UYGUN *et al.*, 2011).

A mortalidade relacionada às cirurgias vasculares de grande porte ainda é problema que preocupa os cirurgiões em todo o mundo. As cirurgias em artérias periféricas podem ter evolução não favorável, com uma mortalidade que pode chegar a mais de 10% (YASSIN *et al.*, 1996). A cirurgia para correção aberta de aneurisma de aorta abdominal cursa com mortalidade em torno de 1% a 10% nos melhores centros mundiais (KATZ *et al.*, 1994). Para simular tal situação clínica foi adotado o modelo experimental de I/R por Stalke, com clampeamento da aorta infra-renal e isquemia dos membros caudais de ratos Wistar (STALKE, 2001). O rato foi escolhido como modelo, pois apresenta as vantagens da semelhança genética, o baixo custo, facilidade de obtenção e a praticidade de se executar o modelo de isquemia escolhido. O número de animais foi autorizado pelo Comitê de Ética considerando a prerrogativa de utilizar o menor número capaz de determinar resultados significantes para o tipo de estudo, totalizando trinta e cinco animais aleatoriamente distribuídos nos cinco grupos

O dano da reperusão pode ser local ou sistêmico e causado pela liberação de diversos subprodutos do estresse oxidativo, bem como de outros mediadores humorais. Trata-se de reação complexa, explosiva cuja peroxidação das membranas e a carbonilação de proteínas promovem o desarranjo das estruturas celulares (membranas, citoesqueleto, núcleo) e comprometimento da respiração mitocondrial



e da geração energética (ROLIM *et al.*, 2007). Obviamente, quanto maior o período de isquemia, maiores serão as alterações celulares irreversíveis. Neste estudo, conforme descrito anteriormente, o tempo de clampeamento e consequente isquemia foi de 2 horas seguidos de reperfusão e coleta de amostras 72 horas após. Embora não exista padronização dos tempos de isquemia e reperfusão essenciais para a ocorrência de lesões teciduais, fato já notado por Silveira (SILVEIRA *et al.*, 2004). A escolha pela isquemia de 120 minutos baseou-se em técnica bem consolidada. Schoenberg e Berger definiram que em uma hora de isquemia a mucosa intestinal já possuía danos importantes e, com duas horas, os danos já seriam irreversíveis, vários estudos foram desenvolvidos, geralmente com o tempo variando de uma a duas horas de isquemia. (SCHOENBERG *et al.*, 1993)

Em vários estudos experimentais, modelos de isquemia cardíaca, o PoCI tem apresentado resultados semelhantes ao PrCI na prevenção das lesões resultantes do processo de isquemia e reperfusão (SANTOS *et al.*, 2009). Donato e colaboradores (2004) utilizando corações isolados de coelhos e realizando o PoCI com dois ciclos de reperfusão e isquemia de 30 segundos cada, concluíram que o PoCI reduziu o tamanho do infarto na mesma magnitude que o PrCI, sem modificar a disfunção ventricular pós-isquêmica (DONATO *et al.*, 2004). Em outro estudo, o PoCI foi capaz de minimizar a área de infarto em comparação ao grupo controle, realizando-se quatro ciclos de reperfusão e isquemia com duração de 30 segundos antes de se dar a fase de reperfusão (DARLING *et al.*, 2005). O PoCI foi tão eficaz quanto o PrCI na prevenção das lesões decorrentes do processo de isquemia e reperfusão coronariana em ratos, desde que o tempo de isquemia não ultrapasse 45 minutos (TANG *et al.*, 2006). E em medula espinhal de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão (HUANG *et al.*, 2007). O método já foi também analisado em seres humanos, onde foi relatado seu efeito benéfico realizando reperfusão intermitente durante angioplastia em pacientes com infarto agudo do miocárdio, tendo observado redução da injúria miocárdica (STAAT *et al.*, 2005). Outro estudo experimental em seres humanos observou efeito protetor do PoCI, quando provocaram isquemia transitória no membro superior seguida de reperfusão (LOUKOGEORGAKIS *et al.*, 2006).

Embora o mecanismo envolvido na proteção do PoCI no processo de isquemia mesentérica não esteja elucidado, Santos e colaboradores (2009)

sugeriram que o aporte de oxigênio realizado de forma controlada, no tecido isquemiado pode estar relacionado à uma redução significativa nos níveis de malondialdeído e produtos relacionados a peroxidação lipídica e menor injúria mediada por oxidantes. O pico de produção de ERO ocorre entre o primeiro e o sétimo minuto após o início da reperfusão, embora sejam detectáveis tais substâncias em períodos mais tardios (DARLING *et al.*, 2005). O PoCI age nesta fase de forma ainda não totalmente esclarecida, provavelmente atenuando a produção de ERO pela liberação paulatina de oxigênio aos tecidos (KIN *et al.*, 2004). Por este motivo, realizou-se no presente estudo o PoCI logo após a isquemia, realizando-se 3 ciclos de 2 minutos de reperfusão intercalados com 3 ciclos de isquemia de 2 minutos.

Evidências apontam fortemente para um importante papel da xantina oxidase como fonte dos ERO nesse processo, uma vez que se conhece o seu desempenho na patogênese das lesões de isquemia-reperfusão, principalmente em intestinos (GRANGER *et al.*, 1981). Tanto a inibição da xantina oxidase com oxipurinol quanto a sua depleção com uma dieta deficiente em molibdênio e suplementada por tungstênio foram capazes de atenuar o aumento da permeabilidade microvascular no processo de isquemia-reperfusão. (SMITH *et al.*, 1989). Ainda caracterizando e tentando confirmar o aumento da permeabilidade microvascular como decorrente da atuação de radicais livres lesivos, mais especificamente do radical hidroxila, provocaram uma isquemia de duas horas, seguida por 30 minutos de reperfusão, em músculos esqueléticos de ratos. Utilizando a desferroxiamina e a apotransferrina como pré-tratamento, os autores buscaram evitar a formação do radical hidroxila produzido através da reação de Haber-Weiss (ou de Fenton), que utiliza o ferro com esse fim. Observou-se, então, uma grande atenuação do aumento da permeabilidade microvascular, e o radical hidroxila foi mais uma vez confirmado como bastante lesivo.

Durante a isquemia, ocorre aumento da atividade da fosfolipase A2, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e a conversão da xantina desidrogenase na forma oxidase. Na reperfusão a hipoxantina acumulada é oxidada em xantina pela XO e a xantina é transformada em ácido úrico. Nessa reação a XO transfere elétrons para o oxigênio molecular, gerando radicais livres instáveis: radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). Logo a ação da XO gera radicais livres

do oxigênio nos tecidos reperfundidos, potenciais causadores da lesão I/R (CUNHA *et al.*, 2005).

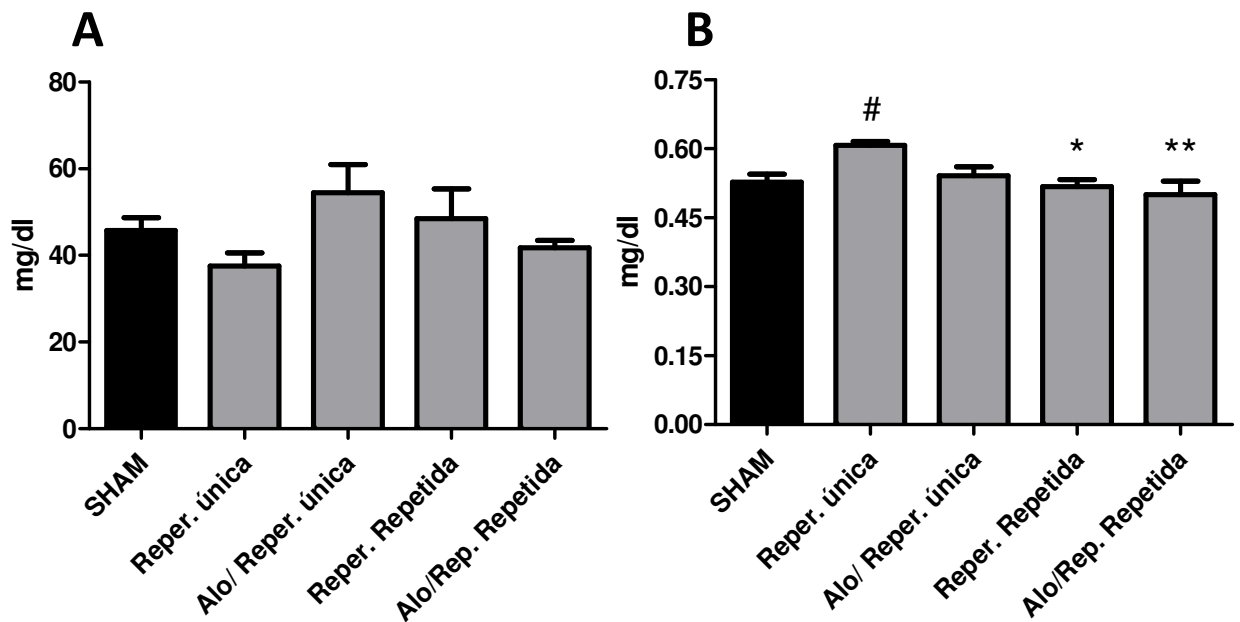
A busca por uma droga que reduza a liberação de espécies reativas do oxigênio, bem como a tentativa de limitar a resposta inflamatória constitui uma hipótese para o controle das lesões de isquemia e reperfusão. Estudos experimentais têm sido realizados com o intuito de verificar a eficácia do uso de substâncias antioxidantes no sentido de prevenir ou atenuar as lesões decorrentes da isquemia e reperfusão, a saber: vitamina E, ácido ascórbico, deferoxamina, a estreptoquinase, o alopurinol, os sais de magnésio, os aminoesteróides, os quelantes de ferro e os antiinflamatórios não esteroides, substâncias varredoras de radicais livres “*scavengers*”. O alopurinol apresenta uma estrutura análoga à da hipoxantina, agindo como inibidor da enzima XO, o que leva a uma menor produção do radical superóxido, um dos causadores do estresse oxidativo (FERRO *et al.*, 2010).

Os efeitos benéficos do alopurinol e outros agentes antioxidantes foram bem documentados em modelos de isquemia e reperfusão de retalhos facio cutâneos em ratos e porcos (PRADA *et al.*, 2002). Em isquemia de membros foi observada uma taxa de viabilidade de 60% em membros isquêmicos de ratos por 6 horas e administração de alopurinol (CONCANNON *et al.*, 1991), e observada redução na pressão compartimental de membros amputados em ratos com isquemia de tempos variados e administração de alopurinol (FERRARI *et al.*, 1996). Peralta e colaboradores (2002) no seu estudo com pré condicionamento com isquemia observaram que a inibição da xantina-oxidase com alopurinol atenua o dano inflamatório no pulmão após isquemia e reperfusão hepática.

Realizamos análises bioquímicas nos soros dos animais submetidos a isquemia seguido por reperfusão única, PCI ou tratados previamente com alopurinol. Embora os resultados da análise dos níveis séricos de ureia não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos (FIGURA 3, painel A) a dosagem de creatinina dos ratos do grupo B, submetidos apenas à isquemia e reperfusão única, obtiveram valores significativamente mais altos em relação ao grupo SHAM, comprovando a eficácia do modelo de isquemia utilizado, demonstrando que pode ter sido desencadeado algum nível de lesão renal. Os grupos reperfusão repetida e reperfusão repetida + alopurinol apresentaram redução dos valores de creatinina em

relação ao grupo reperfusão única, apresentando valores semelhantes ao grupo SHAM. O grupo alopurinol + reperfusão única embora tenha apresentado diminuição em relação ao grupo de isquemia, não alcançou diferença estatística (Figura 3, painel B).

**FIGURA 3** - Avaliação dos marcadores plasmáticos de ureia e creatinina.



Fonte: o autor

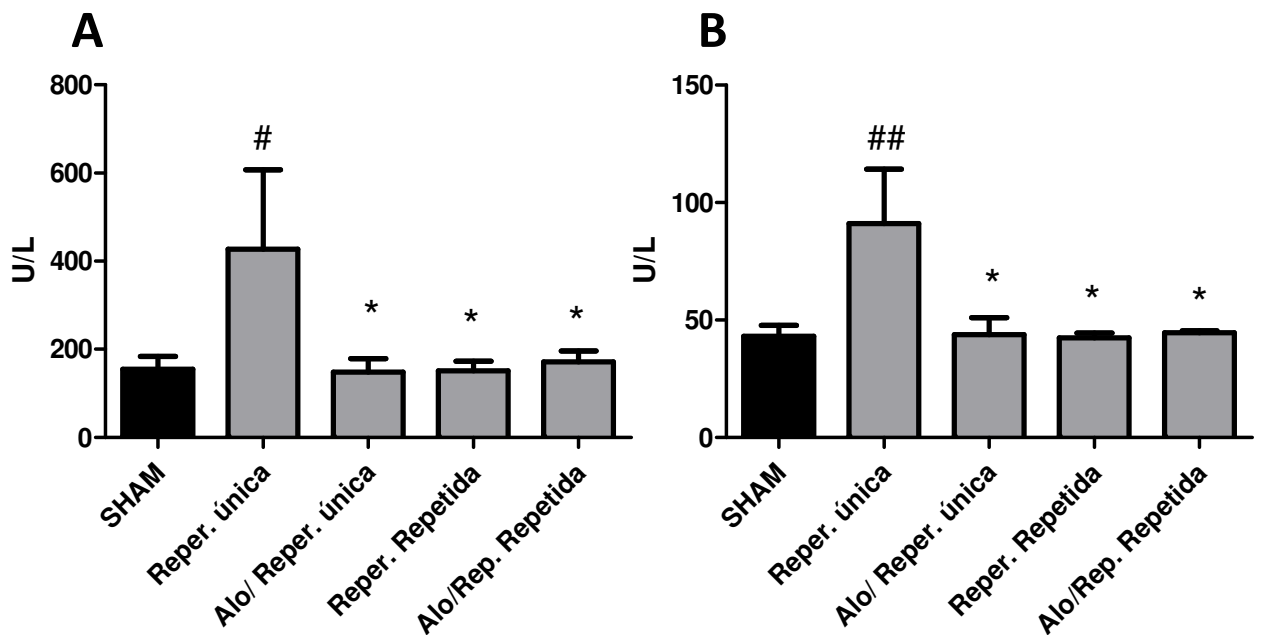
Nota: O sangue dos animais foi coletado 72 horas após a realização do procedimento cirúrgico para quantificação dos níveis plasmáticos de ureia (painel A) e creatinina (painel B). ANOVA de uma via e pós teste de Tukey \* e \*\* $p < 0,05$ , comparado com o respectivo grupo Reperfusão única; # $p < 0,05$ , comparado com o grupo SHAM.

Sabe-se que a creatinina é produzida a partir da fosfocreatina muscular, dependendo, portanto, do metabolismo das células musculares, sendo pouco afetada pela dieta. Já a ureia tem seus níveis sanguíneos alterados de acordo com o tipo e a quantidade de alimentação. Portanto, os níveis séricos de creatinina são mais confiáveis que os níveis séricos de ureia para a avaliação da lesão renal (PERCÁRIO, 2010). Como não houve redução da perfusão renal nem obstrução pós-renal durante os experimentos e os animais receberam a mesma dieta, é possível que as flutuações na uremia estejam relacionadas ao grau de desidratação sofrido pelos animais durante os experimentos. Os valores de creatinina dos ratos dos grupos pós condicionamento isquêmico indicaram efeito protetor desta técnica

na lesão de isquemia e reperfusão, tendo os seus níveis bem próximos ao do grupo SHAM. Portanto, assim como o pré condicionamento isquêmico que inicialmente foi descrito em isquemia miocárdica e depois foi introduzido no estudo de isquemia e reperfusão para outros tecidos, o pós-condicionamento segue o mesmo caminho (SCHIMIDT *et al.*, 2007).

A lesão hepática pode ser avaliada a partir do nível das enzimas hepáticas, a alanina e a aspartato transaminase (ALT e AST), que acima do normal, indicam algum nível de dano hepático (JESCHKE *et al.*, 2001). Essas enzimas são ainda consideradas os marcadores mais sensíveis da lesão isquêmica no fígado por apresentarem altas concentrações nesse órgão (GIANNINI *et al.*, 2005). Em tempos variados de isquemia hepática, é possível verificar um aumento significativo da ALT e AST em grupos isquêmicos em relação ao controle. Boin e colaboradores (2006) verificaram aumento da ALT (1013 U/L) após 15 minutos de reperfusão após isquemia hepática de 90 minutos em ratos Wistar (BOIN *et al.*, 2006). Neste estudo, os níveis de ALT e AST (Figura 4, painéis A e B) foram alterados pela indução de isquemia e reperfusão única, demonstrando que o modelo provavelmente foi capaz de induzir algum nível de lesão hepática. O tratamento com alopurinol, o Pós condicionamento Isquêmico, assim como o grupo com associação das duas abordagens apresentou valores das enzimas similares ao grupo Sham, ou seja, um retorno aos valores normais, corroborando os efeitos protetores do antioxidante e do pós condicionamento.

Santos e colaboradores (2010) em um estudo de isquemia hepática (60 min) seguido por reperfusão, demonstrou que animais submetidos ao procedimento de pós condicionamento isquêmico apresentaram redução significativa nos níveis de AST e ALT. Animais do grupo isquemia com reperfusão única apresentaram média de TGP 355 U/L enquanto que o grupo submetido ao pós condicionamento (3 ciclos de isquemia/reperfusão, de 30 segundos cada) apresentaram média de 175 U/L. Nesse mesmo estudo também houve redução significativa nos níveis de TGO.



**FIGURA 4** - Avaliação dos marcadores plasmáticos de AST e ALT

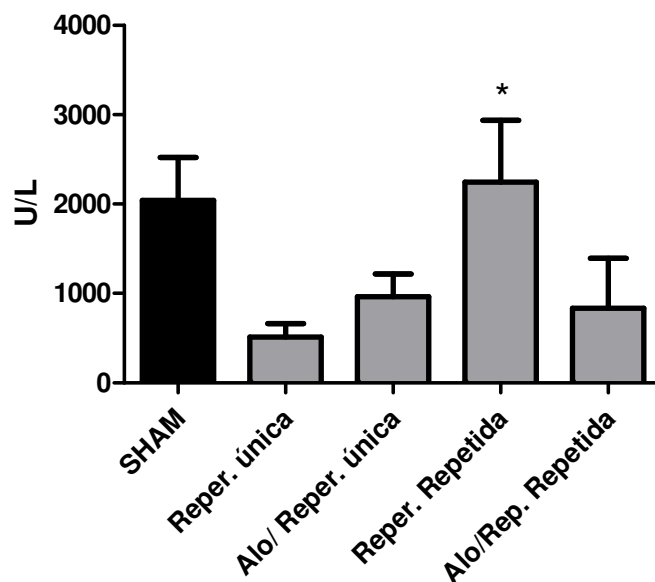
Fonte: o autor

Nota: O sangue dos animais foi coletado 72 horas após a realização do procedimento cirúrgico para quantificação dos níveis plasmáticos de TGO (AST) (painel A) e TGP (ALT) (painel B). ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , comparado com o respectivo grupo Reperusão única; # $p < 0,05$ , comparado com o grupo SHAM.

A creatinofosfoquinase (CPK) é uma enzima encontrada em alta concentração no músculo esquelético, miocárdio e cérebro. Seus níveis aumentam proporcionalmente com o desenvolvimento de alterações musculares degenerativas (PEDRINI *et al.*, 1994). Alguns autores evidenciaram que os níveis de CPK se elevam significativamente após 2 horas de isquemia muscular (PUNCH *et al.*, 1992). Altos valores desta enzima usualmente refletem necrose muscular avançada. Conforme outros estudos experimentais, a CPK desaparece muito mais lentamente que outros metabólitos séricos como a mioglobina. Em casos de isquemia moderada, as concentrações séricas de CPK podem-se elevar a 1000 ou 2000 UI/l, retornando a níveis normais 10 a 12 dias após a revascularização (PEDRINI *et al.*, 1994). Em relação a dosagem de CPK (FIGURA 5) houve uma grande variação de resultados entre os grupos, não permitindo a obtenção de dados com distribuição

normal e variâncias homogêneas. Tal variação pode ser atribuída às doses de manutenção anestésica que eram administradas via intramuscular nos membros superiores. Acreditamos que todos os animais apresentaram algum nível de lesão nos músculos desses membros pois foi observado um número significativo de animais que evoluíram com plegia e impotência funcional de tais membros após o procedimento cirúrgico. Caso os experimentos venham a ser repetidos uma via alternativa de anestesia deverá ser utilizada para evitar esses eventos.

**FIGURA 5** - Avaliação do marcador plasmático creatinoquinase – CPK



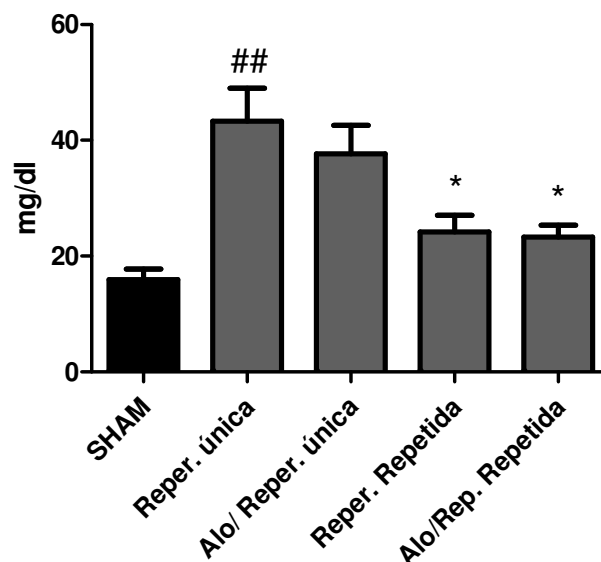
Fonte: o autor

Nota: O sangue dos animais foi coletado 72 horas após a realização do procedimento cirúrgico para quantificação dos níveis plasmáticos de creatinoquinase

Nesse estudo também dosamos os níveis de lactato de todos os grupos. O lactato é produto do ciclo anaeróbico e seu acúmulo correlaciona-se diretamente com a duração e a intensidade da isquemia. Observando o gráfico dos níveis de lactato obtidos nesse trabalho (FIGURA 6), podemos perceber que os animais do grupo isquemia apresentaram um aumento significativo de lactato quando comparado aos animais *sham*. O grupo do alopurinol, demonstrou proteção da ação

dos ERO, porém sem significância estatística, o que poderia ser confirmado com um N maior. O pós condicionamento (reperfusão repetida) e o grupo de pós condicionamento + alopurinol preveniu o aumento deste marcador, já que os níveis de lactato desses grupos estão próximos dos níveis dos grupos *sham*. Considerando que o grupo que recebeu apenas o tratamento com o alopurinol não apresentou diferença em relação ao grupo isquemia/reperfusão única, acreditamos que no último grupo o pós-condicionamento foi a abordagem que realmente apresentou resultado efetivo.

**FIGURA 6** - Avaliação do marcador plasmático lactato



Fonte: o autor

Nota: O sangue dos animais foi coletado 72 horas após a realização do procedimento cirúrgico para quantificação dos níveis plasmáticos de Lactato. Anova de uma via e pós teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , comparado com o respectivo grupo isquemia; ## $p < 0,01$ , comparado com o grupo SHAM.

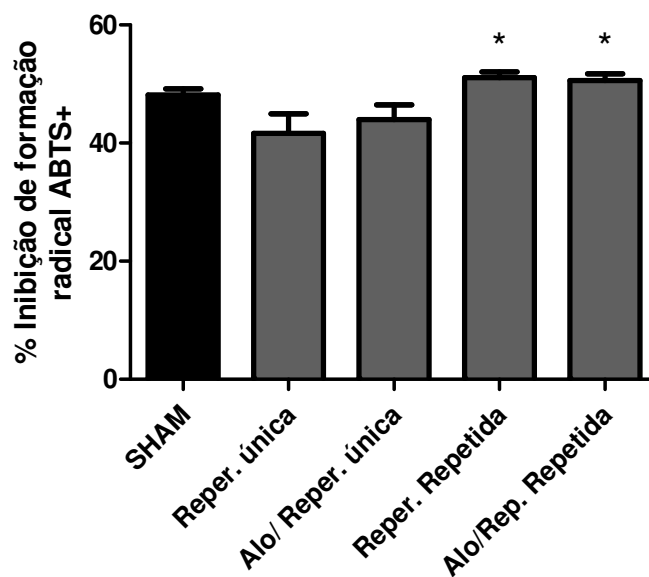
O lactato não é considerado um marcador específico de dano celular, mas tem sido associado com eventos isquêmicos na mucosa intestinal. Os níveis de lactato permanecem elevados 72 horas depois de um evento de isquemia/reperfusão intestinal em ratos (HEY *et al*, 2008). Sola e colaboradores (2001) demonstraram que o evento de pré condicionamento em tecido intestinal submetidos a isquemia antes de serem transplantados reduziu os níveis de liberação



de lactato, relacionado a uma redução no recrutamento de neutrófilos para o intestino.

Além dos marcadores bioquímicos foi avaliado no soro dos animais de todos os grupos a capacidade antioxidante total (CAT). Na figura 7 é possível observar que os animais submetidos a reperfusão repetida e submetidos a reperfusão repetida + alopurinol apresentaram aumento na CAT em relação ao grupo isquemia/reperfusão única. Considerando que o grupo que recebeu apenas o tratamento com o alopurinol não apresentou diferença em relação ao grupo isquemia/reperfusão única, acreditamos que no último grupo o pós-condicionamento foi a abordagem que realmente apresentou resultado efetivo.

**FIGURA 7** - Avaliação da capacidade antioxidante total – CAT



Fonte: o autor

Nota: O sangue dos animais foi coletado 72 horas após a realização do procedimento cirúrgico para quantificação dos níveis plasmáticos de capacidade antioxidante total. ANOVA de uma via e pós teste de Dunnett. \* $p < 0,05$ , comparado com o grupo reperfusão única.

A capacidade antioxidante total tem a finalidade de determinar a resposta do organismo frente a produção de radicais livres ou formas reativas de oxigênio. Sabe-

se que essa capacidade tem um limite e quando este é ultrapassado inicia-se um processo de estresse oxidativo resultando em distúrbios morfológico-funcionais das células acometidas (BOVERIS, 1998). Neto e colaboradores (2005) demonstraram que a CAT é reduzida nos rins, músculos estriados esqueléticos e no soro de ratos submetidos a eventos de isquemia reperfusão de membros posteriores, em um procedimento similar ao realizado em nesse trabalho.

Por último foram realizadas análises histológicas de amostras de intestino delgado dos animais de todos os grupos (FIGURAS 8 a 12). As lâminas histológicas foram analisadas utilizando o grau de lesão intestinal segundo Chiu e colaboradores (1970) e os resultados foram sumarizados na Tabela 1.

Como resultado, obteve-se aumento das lesões no grupo de isquemia, o que ficou evidente pela elevação da mediana do grupo em questão. Nos grupos do Alopurinol, no grupo PCI e no grupo Alopurinol com PCI, observou-se um claro efeito protetor, com medianas de 1, próximos ao do Sham, que foi 0, demonstrando claro efeito protetor.

**TABELA 1.** Resultado da análise histológica dos graus de lesão das mucosas intestinais segundo a classificação de Chiu e colaboradores (1970)

Ratos	Graus de Lesão da Mucosa Intestinal				
	SHAM	Reperfusão única	Alo/Reperfusão única	Reper.Repetida	Alo/Reper. Repetida
1	0	2	0	2	3
2	1	3	3	1	1
3	0	2	1	0	0
4	0	3	1	1	0
5	0	3	1	1	1
6	0	1	1	-	-
7	1	-	1	-	-
<b>Mediana</b>	<b>0</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

FONTE: o autor

No presente estudo ficou demonstrada a capacidade do pós condicionamento e do tratamento com alopurinol em minimizar os efeitos lesivos do processo de

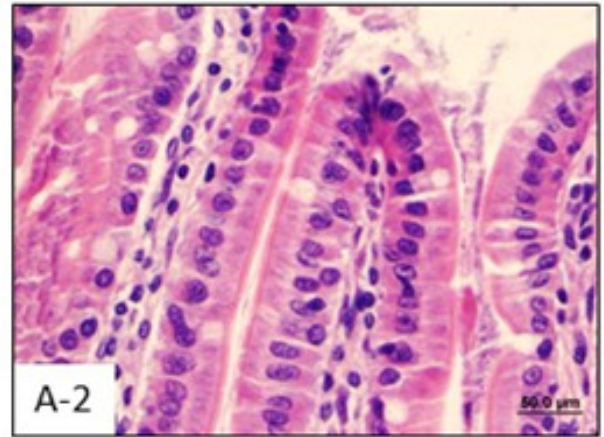
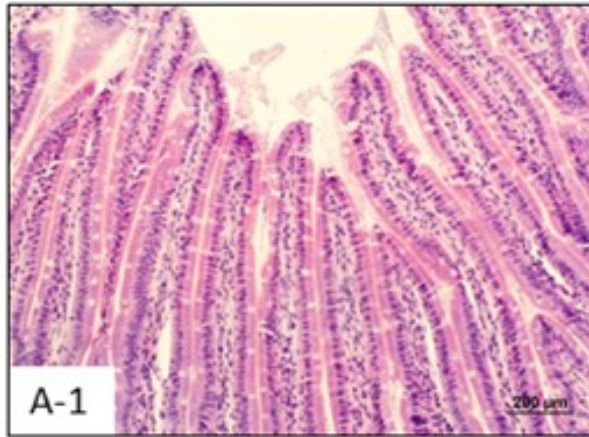
isquemia e reperfusão mesentérica, uma vez que as medianas do grau de lesão foram significativamente menores que o grupo isquemia reperfusão única (Tabela 1).

Kaçmaz e colaboradores (1999), estudando o Alopurinol como antioxidante na isquemia e reperfusão intestinal, obtiveram média 4,6 na classificação histológica de CHIU e colaboradores para o grupo controle (isquêmico) e 1,8 para o grupo Alopurinol. Estes autores utilizaram 5 ratos Sprague-Dawley em cada grupo e mantiveram os animais por quarenta minutos de isquemia seguidos por quarenta minutos de reperfusão

Sola e colaboradores (2000) comprovaram a capacidade do pré condicionamento em minimizar os efeitos lesivos do processo de isquemia e reperfusão mesentérica. O pós condicionamento também tem apresentado resultados semelhantes ao PrCI na prevenção de lesões resultantes do processo de isquemia/reperfusão, entretanto ainda poucas publicações possam ser encontradas. Zhao e colaboradores (2003) em um estudo realizado com cães, realizando oclusão da artéria descendente anterior esquerda por 60 minutos e 3 ciclos de isquemia/reperfusão com ciclos de 30 segundos cada, apresentou área de infarto significativamente menor que no grupo controle. Santos e colaboradores (2009) em estudos com ratos submetidos a isquemia mesentérica de 30 minutos e 3 ciclos de isquemia/reperfusão com duração de dois minutos cada demonstrou significativa redução na intensidade de lesão tecidual na mucosa intestinal.

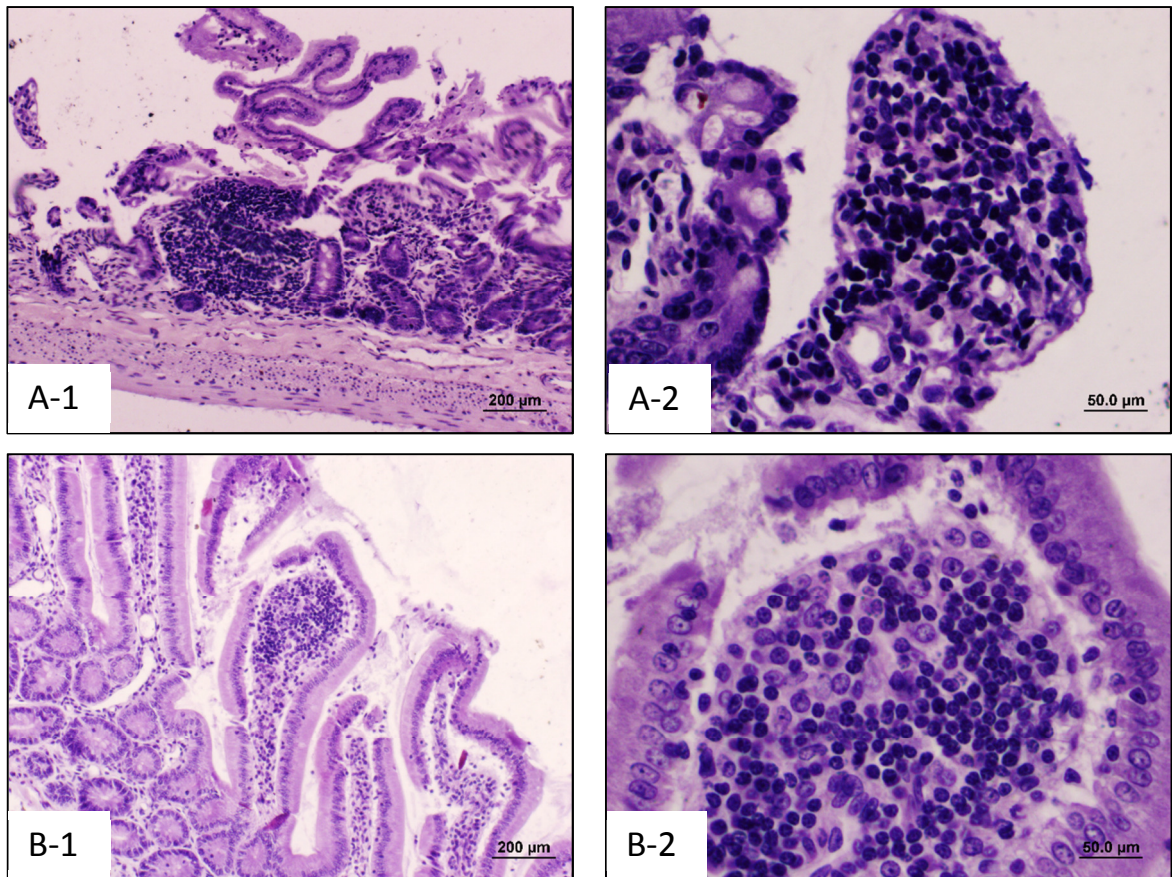
Enfim, todos os estudos acima citados confirmam a relação entre o estresse oxidativo e o dano tissular e que ainda, o alopurinol inibindo a xantina-oxidase, e o pós condicionamento inibem o referido dano, estando este estudo em concordância com a literatura, o delineamento e os achados.

**FIGURA 8.** Fotomicrografia de corte histológico de intestino delgado de animal do grupo A – SHAM, mostrando mucosa com vilosidades bem constituídas sem alterações (Grau 0). As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x.



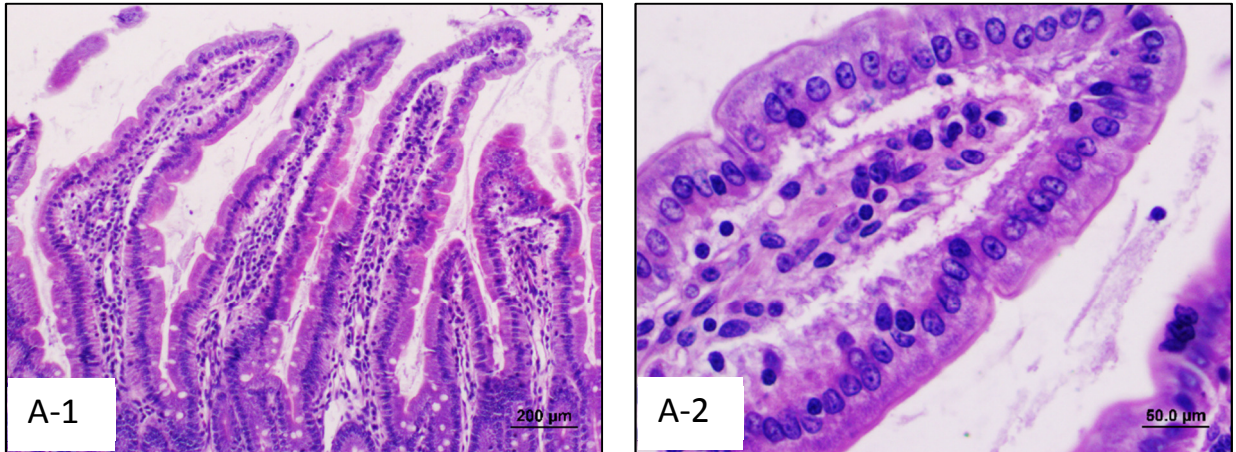
Fonte: o autor

**FIGURA 9.** Fotomicrografia de corte histológico de intestino delgado de animal grupo B – isquemia/reperfusão única, mostrando mucosa com destruição da porção livre de vilosidades e de células inflamatórias (Grau 2 e 3). As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x.



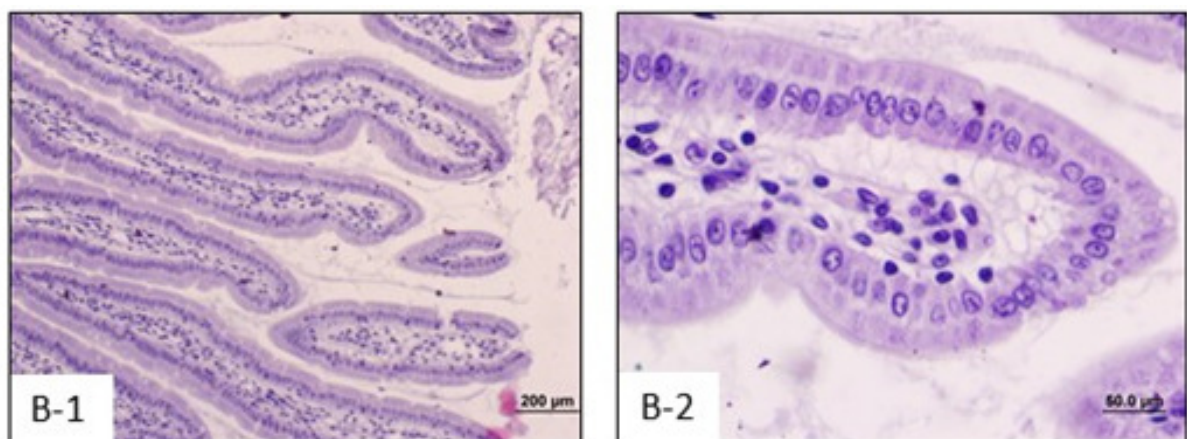
Fonte: o autor

**FIGURA 10.** Fotomicrografia de corte histológico de intestino delgado de animal do grupo C - alopurinol/reperfusão única, mostrando mucosa com vilosidades bem constituídas, sem processo inflamatório, mas com formação de espaço subepitelial (Grau 1). As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x.



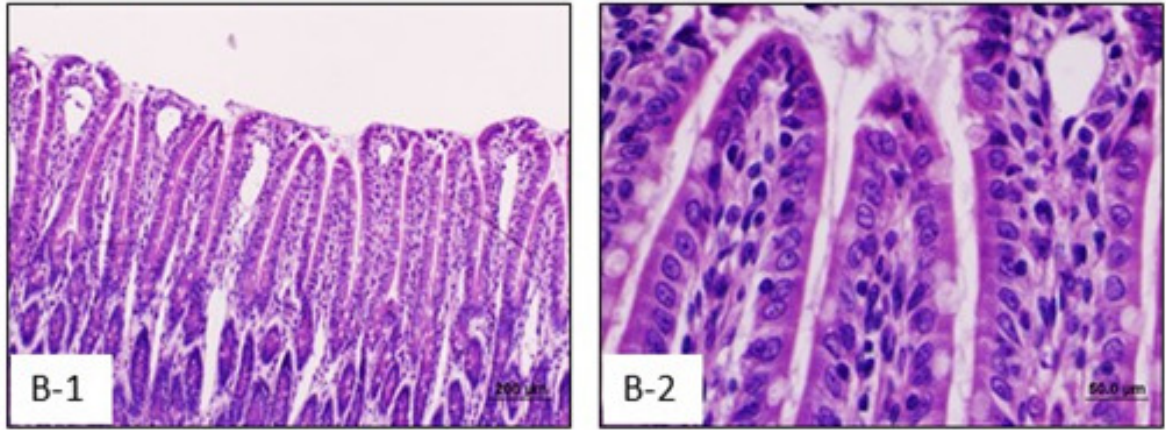
Fonte: o autor

**FIGURA 11.** Fotomicrografia de corte histológico de intestino delgado de animal do grupo D – isquemia/reperfusão repetida, mostrando mucosa com vilosidades bem constituídas, sem processo inflamatório, mas com formação de espaço subepitelial (Grau 1). As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x.



Fonte: o autor

**FIGURA 12.** Fotomicrografia de corte histológico de intestino delgado de animal do grupo E – Alopurinol/isquemia/reperfusão repetida C - alopurinol/reperfusão única, mostrando mucosa com vilosidades bem constituídas, sem processo inflamatório, mas com formação de espaço subepitelial (Grau 1). As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x.



Fonte: o autor

## 6. CONCLUSÕES

No modelo proposto neste estudo de isquemia e reperfusão de membros caudais, em animais submetidos à 2 horas de isquemia, demonstrou-se que em relação ao grupo controle ocorreu aumento da creatinina, da AST, da ALT e do lactato com aumento da lesão na mucosa intestinal.

Os animais tratados com alopurinol, e/ou pós condicionamento isquêmico, apresentaram diminuição da creatinina, da AST, da ALT e do lactato, com preservação da capacidade antioxidante total. Além disso, houve redução das lesões de reperfusão em mucosa intestinal. Assim sendo, o presente estudo sugere que o alopurinol e mais notadamente o pós condicionamento exercem efeito protetor aos danos causados pela isquemia reperfusão, mas não sua completa inibição.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA F.A.; SENEDAM.M.; ALFIERI A.A. Consequences of production of reactive oxygen species in reproduction and main antioxidant mechanisms **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010.
2. ANDRADE SC, SUYAMA CM, HAGA HH, SHIBUYA CA, ISHIDA LA, VATTIMO MFF. Insuficiência renal aguda isquêmica: mecanismo oxidativo. **J Bras Nefrol**;23(2):62 [Apresentado ao VIII encontro Paulista de Nefrologia; 2001, maio 9-12; Águas de Lindóia, SP] 2001.
3. BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**. São Paulo, v.29, n.1, fev. 2006.
4. BERGMEYER, Bowers and cols., **Clin. Chim., Acta.**, 1.976, 70, 19 - 42, , 21 1977
5. BEYERSDORF F, MATHEIS G, KRUGER S, ET AL. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: experimental observations and recommendations for clinical application. **J Vasc Surg**;9:757-66. 1989.
6. BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. Campinas, v.12, n.2, mai./ago.1999.
7. BITU-MORENO J; FRANCISCHETTI I; HAFNER L. Lesões de isquemia-reperfusão em músculos esqueléticos. **J Vasc Br**, Vol. 1, Nº2, 2002.
8. BLAISDELL, T.W.; STEELE, M.; ALLEN, R.E. Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis. **Surgery**, St Louis, v.84, p.822-834, 1978.
9. BOIN, I. F. S. F.; SILVA, O. C. S.; SOUZA, M. E. J.; SANTOS, A.C. LEONARDI, L. S. Pyruvate kinase activation and lipoperoxidation after selective hepatic ischemia in Wistar rats. **Acta Cir Bras**. 21: 19-23, 2006.
10. BORG D.C.; SCHAICH K.M.: Iron and iron-derived radicals. In Halliwell B (ed): Oxygen radicals and tissue injury. **Proceedings of a Brook Lodge Symposium**; 1987 Apr 27-29;
11. BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**. 58:350-356, 1998.

12. BUDDE JM, MORRIS CD, VELEZ DA, MURAKI S, WANG NP, GUYTON RA, ET AL. Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. **J Surg Res**;116(1):104-15. 2004.
13. CHIU, C. J.; MCARDLE, A. H.; BROWN, R.; SCOT, H. J.; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. A morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. **Arch Surg**. 101: 478-483, 1970.
14. CIZ M, CIZOVA A, CHEVION M, LOJEK A, KUBALA L, PAPEZIKOVA I. Ischemia-reperfusion injury of rat small intestine: The effect of allopurinol dosage. **Transplant Proc**;33: 2871-3. 2001.
15. CONCANNON MJ, DOOLEY TW, PUCKETT CL - Improved survival in a replantation model containing ischemic muscle. **Microsurgery**., 12(1):18-22.1991.
16. CUNHA MS; SILVA JCF DA; NAKAMOTO H; SIMÃO DT; FERREIRA MC. Efeito do alopurinol e terapia com oxigênio hiperbárico em modelo de reimplante de membro após isquemia quente em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir**. Vol. 32 - Nº 2, Mar. / Abr. 2005.
17. DARLING, C. E.; JIANG, R.; MAYNARD, P.; WHITTAKER, P.; VINTEM-JOHANSEN, J.; PRZYLENK, K. P Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. **Am J. Physiol. Heart Circ Physiol**. 289:618-626, 2005.
18. DAVID, B.; SACKS, M. B., Ch.B. F.A.C.P. Carbohydrates In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. **Tietz Book of Clinical Chemistry**. 3 ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; p. 787-790. 1999.
19. DIDONÉ EC, CERSKI CT, KALIL NA. N-acetilcisteína diminui a congestão hepática na lesão de isquemia e reperfusão: estudo experimental / N-acetylcysteine decreases hepatic congestion in the ischemia-reperfusion injury: experimental study. **Rev. Col. Bras. Cir**;29(4):191-196, jul.-ago. 2002
20. DONATO, M. ANNUNZIO, V.; SABAN, M. FLOR, L; GELPI, R. J. Poscondicionamiento: un Nuevo mecanismo protector. Su comparacion co el preconditionamiento en el infarto experimental. **Rev Arg Cardiol**. 72: 258-62, 2004.
21. EATON JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). **J Lab Clin Med**; 118: 3-4. 1991.
22. EVORA, P.R.B. ET AL. Lesão de Isquemia-Reperfusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial.. São Paulo, v.66, n.4, set./fev. 1996.

23. EVORA, P.R.B. ET AL. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia** p. 434-437.2000.
24. FAUL, F., ERDFELDER, E., LANG, A.-G., & BUCHNER, A.. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, 39, 175-191. 2007.
25. FERRARI R. Pathophysiological vs biochemical ischaemia: a key to transition from reversible to irreversible damage. **Eur Heart J Supp**;3 Suppl:C2-C10. 2001.
26. FERRARI RP, BATTISTON B, BRUNELLI G, ET AL. - The role of allopurinol in preventing oxygen free radical injury to skeletal muscle and endothelial cells after ischemia-reperfusion. **J Reconstr Microsurg.**, 12(7):447-450.1996.
27. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo **Rev Ass Med Brasil**; 43(1): 61-8. 1997.
28. FERRO, C.O.; CHAGAS. V.L.A.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L.; Schanaider, A.: Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Rev. Col. Bras. Cir.**; 37(1): 031-038. 2010.
29. FORMIGLI L, ET AL. Vitamin E prevents neutrophil accumulation and attenuates tissue damage in ischemic-reperfused human skeletal muscle. **Histol Histopathol**;12(3):663-9. 1997
30. FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W.B.: Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão **Rev Bras Cir Cardiovasc**; 25(4): 575-584. 2010.
31. FURLANI GX, SANTOS AJ, JÚNIOR OF, LINAR F. SALVAMENTO DE MEMBRO EM PACIENTE COM OCLUSÃO ARTERIAL AGUDA TARDIA **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 12, n. 3, p. 30 - 33, 2010
32. GARDÈS-ALBERT M, JORE D, FERRADINI C. Membrane lipid peroxidation: pulse and  $\gamma$ -radiolysis in oxyradical research. In VigoPelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Santa Clara, CRC Press,; 2-30. 1991.
33. GIANNII, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**. 172: 367-379, 2005.
34. GOMEZ RZ, BITTENCOURT JM, GLADINO DT, CAMPANERUTTI GA. Influência do alopurinol e da gentamicina nos efeitos da isquemia e reperfusão de membros caudais em ratos Wistar. **REV. BRAS. MED.INTERNA** 1(1):36-42. 2014;

35. GOMES RZ. Efeito do alopurinol sobre as repercussões da isquemia e reperfusão de membros caudais de ratos Wistar. (**Tese de doutorado**) Curitiba, Universidade Federal do Paraná; 2007.
36. GRANGER DN, RUTILI G, MCCORD JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**;81:22-9. 1981.
37. GRANGER DN, HOLLWARTH ME, PARKS DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiol Scand Suppl**;548:47-63. 1986.
38. GREENE, E.L.; PALLER, M.S. Xanthine oxidase produce O<sub>2</sub> in porthypoxic injury of renal epithelial cells. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.263, p.251-255, 1992.
39. HACKEL, D.B.; JENNINGS, R.B. The Heart. In: RUBIN, E.; FARBER, D.J. (Ed.). **Pathology**. Philadelphia: Lippincott,. p.515-525. 1988.
40. HAIMOVICI H. Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria. **Surgery**;47:739-47. 1960.
41. HAIMOVICI H, ASCER E, HOLLIER LH, STRANDNESS JR DE, TOWNE JB. Vascular Surgery – Principles and techniques. 3rd ed. **Stamford, CT**: Appleton & Lange;. p. 330-408. 1985.
42. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**; 246: 501-14. 1986.
43. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2<sup>nd</sup>. Oxford: Clarenton Press, 1989.
44. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**; 186: 1-85. 1990.
45. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford, 1999.
46. HALKOS ME, KERENDI F, CORVERA JS, WANG NP, KIN H, PAYNE CS, ET AL. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. **Ann Thorac Surg**.;78(3):961-9. 2004.
47. HEI, Z. Q.; GAN, X. L.; HUANG, P.J.; WEI, J. SHEN, N.; GAO, W. L. Influence of Ketotifen, Cromolyn Sodium, and Compound 48/80 on the survival rates after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. **BMC Gastroenterol**. 8:42-53, 2008.

48. HIMMELFARB J, MCMONAGLE E, FREEDMAN S, KLENZAK J, MCMENAMIN E, LE P, ET AL. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. **J Am Soc Nephrol.**;15(9):2449-56. 2004.
49. HUANG H, ZHANG L, WANG Y, YAO J, WENG H, WU H, ET AL. Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemicreperfusion injury in rabbits. **Can J Anaesth.**;54(1):42-8. 2007.
50. JESCHKE MG, LOW JF, SPIES M, VITA R, HAWKINS HK, HERNDON DN, ET AL. Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in liver of burned rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**;280(6):G1314-20. 2001.
51. KAÇMAZ M, OZTURK HS, KARAAVVAZ M, GUVEN C, DURAK I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of na allopurinol plus antioxidant combination **Can J Surg**; 42: 427-31,1999
52. KIN H, ZHAO ZQ, SUN HY, WANG NP, CORVERA JS, HALKOS ME, ET AL. Postconditioning attenuates myocardial ischemiareperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. **Cardiovasc Res.**;62(1):74-85. 2004.
53. KORTHUIS, R.J.; SMITH J.K.; CARDEN D.L. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. **American Journal of Physiology**. Bethesda, v.1, n.2, jan. 1989.
54. KUMAR V.; ABBAS A.K.; FAUSTO N. **Bases Patológicas das Doenças**. São Paulo: Elsevier,.Cap 1,p.24-29. 2005.
55. LINDSAY T, WALKER PM, MICKLE AG, Romaschin AD. Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia-reperfusion in canine skeletal muscle. **Am J Physiol**;254(3 Pt 2):H578-83. 1988.
56. LOUKOGEORGAKIS SP, PANAGIOTIDOU AT, YELLON DM, DEANFIELD JE, MACALLISTER RJ. Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. **Circulation**. 2006;113(7):1015-9.
57. MAIA MS. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. **Tese (doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

58. MIRANDA, L.E.C. ET AL. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. São Paulo, v.19, n.1 , jan./fev. 2004.
59. MITCHELL RN, KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Inflamação aguda e crônica. In: **Robbins & Cotran: fundamentos de patologia**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier;. p.29-54. 2006.
60. MONTAVO-JAVE, E.E.E. ET AL. Lesion por isquemia-reperfusion y trauma hepático. **Trauma**. Madrid, v.11, n. 3, set./dez. 2008.
61. MORENO, J.B. Efeito do alfatocoferol na atuação das lesões da isquemia-reperfusão em membro posterior do rato. **Dissertação (Mestrado)** - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 1991
62. MORIN D, HAUET T, SPEDDING M, TILLEMENT J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. **Adv Drug Deliv Rev**;49:151-74. 2001.
63. MOURA HV, POMERANTZEFF PMA, GOMES WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Rev Bras Cir Cardiovasc.**;16(4):376-87. 2001.
64. MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation.**;74(5):1124-36. 1986.
65. NAUTA R.J. Oxygen derived free radicals in ischemic acute renal ischemia and reperfusion injury in the rat. **Surg Gynecol Obstet**.v.171,1990.
66. NETO, A. F.; SILVA, J. C. C.; FAGUNDES, D. J.; PERCÁRIO, S.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y.; NETO, A. A. M. Oxidative alterations, total antioxidant status and nitric oxide study in rats submitted to ischemia and reperfusion of hind limbs. **Acta Cir Bras**. 20: 134-139, 2005.
67. NEWMAN DJ, Price CP. Renal function and nitrogen metabolites. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; p. 1204-1999.
68. NORDBERG J, ÁRNER ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.
69. OURIEL, K. Acute limb ischemia. In: RUTHERFORD, R.B. *et al.* (Ed.). **Vascular surgery**. 4<sup>th</sup>. Philadelphia: Saunders, p.813-821. 2000.
70. PATERNO F, LONGO WE. The etiology and pathogenesis of vascular disorders of the intestine. **Radiol Clin North Am.**;46:877-85. 2008.

71. PEDRINI L, PISANO E, MASETTI L, MITINI A, FACCHINI A, DE PASQUALE V, RUGGERI A, SACCA A. Ischemia-reperfusion syndrome: an alternative experimental model. **J Cardiovasc Surg**;35:431-6. 1994.
72. PERALTA, C. *ET AL.* Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. **Transplantation**, Baltimore, v.73, p.1203-1211, 2002.
73. PERCÁRIO S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. **Rev Nutr.**;23(2):259-67. 2010.
74. PERRY MO, FANTINI G. Ischemia: profile of an enemy: reperfusion injury of skeletal muscle. **J Vasc Surg**;6:231-4. 1987.
75. PERRY MO. Oxygen free radical scavengers in acute ischemia and reperfusion syndromes. In: Ernest CB, Stanley JC, editors. **Current Therapy in Vascular Surgery**. Philadelphia: B. C. Decker; p. 600-604. 1991.
76. PICCINATO, C.E. Estudo do conteúdo de cálcio, magnésio e potássio mitocondriais de músculo-esquelético de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. **Tese (Livre-Docência)** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, 1991.
77. PINHEIRO, B.V. *ET AL.* Lesão Pulmonar de Reperfusão. **Jornal de Pneumologia**. Brasília, v.25, n.2, mar/abr. 1999.
78. PRADA FS, ARRUNATEGUI G, ALVES MC, *ET AL.* - Effect of allopurinol, superoxide-dismutase, and hyperbaric oxygen on flap survival. **Microsurgery.**, 22(8):352-360. 2002.
79. PUNCH J, REES R, CASHMER B, WILKINS E, SMITH DJ, TILL GO. Xanthine oxidase: its role in the no-reflow phenomenon. **Surgery**;111:245-51. 1992.
80. QUINONES BWJ, SALEH S. Acute arterial occlusion. In: Moore WS. **Vascular Surgery**. A Comprehensive Review. Philadelphia: WB Saunders Co.;33:578-97. 1991.
81. RATYCH RE, CHUKNIYISKA RS, BULKLEY GB. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. **Surgery**;102:122-31. 1987.
82. REIMER, K, A.; JENNINGS, R.B.; TATTUM, A.H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic functional and ultra structural studies. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.52, p.72A-81A, 1983.

83. RHODERN, E. L. : Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome de isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.13, p.73-79, 1998.
84. ROBERTS JP, PERRY MO, HARIRI RJ, SHIRES GT. Incomplete recovery of muscle cell function following partial but not complete ischemia. **Circ Shock**;17:253-8. 1985.
85. ROCHA BC; MENDES RRS; LIMA GV; ALBUQUERQUE GS; ARAÚJO LL; JESUS MNS DE ET AL . Modelo experimental de isquemia: reperfusão intestinal por clampeamento de aorta abdominal em ratos Wistar. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, Junho 2012.
86. ROLIM, MF.; ELEUTHERIO, CA. E.; ELEUTHERIO EC, COLÃO CDA F, PEREIRA GC, SCHANAIDER A. Colonic healing after portal ischemia and reperfusion: an experimental study with oxidative stress biomarkers. **Redox Rep.**;12: 267-74. 2007.
87. RUDERMAN, N.B. Effect of starvation on muscle glucose metabolism: studies with isolated perfused rat hindquarter. **Fed. Proc.**, Bethesda, v.36, p.171-176, 1977.
88. RULEIN, B.B.; SMITH, A.; LIAUW, S. Complement activation and white cell sequestration in post ischemic skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.259, p.H525-H531, 1990.
89. SANTOS CHM. Evolution and challenges in the fisiopatology of the ischemia and reperfusion. **Cardiovasc Sciences Forum.**;1(3):6-8. 2006.
90. SANTOS CHM, GOMES OM, PONTES JCDV. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. **Rev Bras Coloproctol.**;26(1):28-33. 2006.
91. SANTOS C.HM, GOMES OM, PONTES JCDV, MIIJI LNO, BISPO MAF. Post-conditioning: preliminary results of this new option in the treatment of mesenteric ischemia and reperfusion. **Cardiovascular Sciences Forum.**;2(2):13-24. 2007.
92. SANTOS, C. H. M.; PONTES, J. C. D.V.; GOMES, O. M.; MIIJI, N. O.; BISPO. M. A. F. Evaluation of ischemic postconditioning effect on mesenteric ischemia treatment. Experimental study in rats. **Rev Bras. Cir. Cardiovasc.** 24:150-156, 2009.
93. SANTOS, C. H. M.; PONTESM J. C. D. V.; MIIJI, L. N. O.; NAKAMURA, D. I.; GALHARDO, C. A. V.; AGUENA, S. M. Postconditioning effect in the hepatic ischemia and reperfusion in rats. **Acta Cirur Bras.** 25: 163- 168, 2010
94. SARAFIAN, T.A.; BREDESEN, D.E. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? **Free Radic. Res.**, Yverdon, v.20, p.1-6, 1994.



95. SAUEBEIN, L. *et al.* Effect of anthocyanins contained in a blackberry extract on circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. **Planta Med.**, Stuttgart, v.70, p.745-752, 2004.
96. SCHOENBERG MH, BERGER HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. **Crit Care Med.** 1993;21(9):1376-86.
97. SCHIPKE JD, HALKOS ME, KERENDI F, GAMS E, VINTEN-JOHANSEN J. Postconditioning: a brief review. **Arch Med Sci.**;2:137-45. 2006.
98. SCHMIDT MR, SMERUP M, KONSTANTINOV IE, SHIMIZU M, LI J, CHEUNG M, *et al.* Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**;292(4):H1883-90. 2007.
99. SIES H, STHAL W. VITAMINA E E C, Beta-caroteno, e outros carotenoides e antioxidantes. **American Journal of Clinical Nutrition.** Bethesda, v.62, n.6. 1995.
100. SILVA FM DA; SILVEIRA RJ; CURI HALLAL AL DE LC; WILHELM FILHO D; CARDOSO JJD; LEÃO LEV. Efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopurinol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** Vol. 31 - Nº 5, Set. / Out. 2004.
101. SILVEIRA M, YOSHIDA WB. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismo de lesão e perspectivas de tratamento. **J Vasc Br.**;3(4):367-78. 2004.
102. SMITH, A. Role of extracellular calcium in ischemia/reperfusion injury in the skeletal muscle. **J. Surg. Res.**, New York, v.49, p.153-156, 1990.
103. SMITH JK, CARDEN DL, KORTHUIS RJ. Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle. **Am J Physiol**;257(6 Pt 2):H1782-9. 1989.
104. SOLA, A.; HOTTER, G.; PRATS, N.; XAUS, C.; GELPI, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. **Transplantation.** 69:767-772, 2000.
105. SOLA, A.; OCA, J.; GONZALEZ, R.; PRATS, B.; CATAFAU, J, R.; GELPI, E.; JAURRIETA, E.; HOTTER, G. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. **Ann Surg.** 234:98-106, 2001.

106. SOUZA DGS, VIEIRA AT, PINHO V, SOUSA LP, ANDRADE AA, BONJARDIM CA, MCMILAN M, KAHN M, TEIXEIRA MM. NF- $\kappa$ B plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **Br J Pharmacol.**;145(2):246-54. 2005.
107. SOUZA JDS, FERREIRA WM. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Rev Eletr Nutr**, v.4, p.456-461, 2007.
108. STAAT P, RIOUFOL G, PIOT C, COTTIN Y, CUNG TT, L'HUILLIER I, ET AL. Postconditioning the human heart. **Circulation.**;112(14):2143-8. 2005.
109. STADMAN, E.R.; OLIVER, C.H. Metal-catalysed oxidation of proteins. Physiological consequences. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.286, p.901-905, 1991.
110. STHAL, R.F.: Cardiac ischemia and endothelial function in the isolated rabbit heart. **J. Surg. Res.**, New York, v.47, p. 97-104, 1980.
111. STALKE, PH. Modelo experimental de endotoxemia em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros caudais. **(Tese de doutorado)** Curitiba, Universidade Federal do Paraná; 2001.
112. TAKHTFOOLADI H.A.; HESARAKI, S.; RAZMARA, F.; TAKHTFOOLADI, M.A.; HAJIZADEH H. Effects of N-acetylcysteine and pentoxifylline on remote lung injury in a rat model of hind-limb ischemia/reperfusion injury. **JBP**, Current Issue: Volume 42 - Number 1 (January/February); 2016.
113. THOMAS, L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft;. p. 374-71998.
114. THOMASSIAN A, CARVALHO F, WATANABE MJ, SILVEIRA VF, ALVES ALG, HUSSNI CA, NICOLETT JLM. Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de equinos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n.3, p. 183-190, 2007.
115. THOMPSON A, HEMPHILL D, Jeejeebhoy KN. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. **Dig Dis.**;16:152-8. 1998.
116. TANG XL, SATO H, TIWARI S, DAWN B, BI Q, LI Q, et al. Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions < 45 min. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**;291(5):H2308-17. 2006.

117. TSANG A, HAUSENLOY DJ, MOCANU MM, YELLON DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3kinase-Akt pathway. **Circ Res.**;95(3):230-2. 2004.
118. TSANG A, HAUSENLOY DJ, YELLON DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**;289(1):H2-7. 2005.
119. UYGUN M, YILMAZ S, PEKDEMIR M, DUMAN C, GÜRBÜZ YS. The diagnostic value of ischemia-modified albumin in a rat model of acute mesenteric ischemia. **Acad Emerg Med.**;18(4):355-9. 2011.
120. VINTEN-JOHANSEN J, ZHAO ZQ, ZATTA AJ, KIN H, HALKOS ME, KERENDI F. Postconditioning: a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Basic Res Cardiol.**;100(4):295-310. 2005.
121. WELBOURN, C.R.B. *et al.* Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of neurotrophyls. **Br. J. Surg.**, Guildorfd, v.78, p.651-655, 1991.
122. WEVER KE, WARLÉ MC, WAGENER F, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van de Vliet JA, *et al.* Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. **Nephrol Dial Transplant.**; 26(10):3108-17. 2011.
123. YANG XM, PHILIPP S, DOWNEY JM, COHEN MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. **Basic Res Cardiol.**;100(1):57-63. 2005.
124. YANG XM, PROCTOR JB, CUI L, KRIEG T, DOWNEY JM, COHEN MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. **J Am Coll Cardiol.**;44(5):1103-10. 2004.
125. YASSIN, M,M,I. *et al.* Mortality following lower limb ischaemia-reperfusion: a sisyemic inflammatory response? **World J. Surg.**, New York, v.20, n.8, p.961-967, Oct. 1996.
126. YOSHIDA WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Cir Vasc e Angiol**;N12:82-95. 1996.
127. ZAGER, R.A.; GMUR, D.J. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. **Acta Physiol.**, Oxford, v.257, p.953-958, 1989.
128. ZHAO ZQ, CORVERA JS, HALKOS ME, KERENDI F, WANG NP, GUYTON RA, *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during

reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**;285(2):H579-88. 2003.

## 8 . ANEXOS

### 8.1 ANEXO A - PROCESSO CEUA 038/2014

**UEPG**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 038/2014**  
Protocolo UEPG – 9816/2014

**Título** – Projeto de pesquisa “Efeito do alopurinol e do pós condicionamento na inibição do traumatismo por reperfusão após isquemia da artéria infra-renala em ratos Wistar”.

**Data de Entrada – 26/06/2014**

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo – 26/06/2014 a 26/06/2016**

**Considerações**

Prezado Professora Dra. Kátia Sabrina Paludo e mestrando Rafael Inácio Brandão:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 30 (trinta) ratas.  
**APROVADO.**

Ponta Grossa, 6 de outubro de 2014.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Marta Lodi  
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP  
Fone: (042) 3220-3264

## 8.2 ANEXO B - PROCESSO CEUA 029/2015

**UEPG**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 029/2015**

Protocolo UEPG – 11592/2015

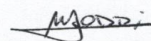
**Título** – Processo 11592/2015 - "Efeito do Alopurinol e do pós-condicionamento na inibição do traumatismo por reperfusão após isquemia da artéria infra-renal em ratos Wistar", solicita a autorização para inclusão de 20 animais. Interessada: Professora Doutora Kátia Sabrina Paludo.

**Data de Entrada – 05/08/2015****Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – 10/08/2015 a 26/06/2016****Considerações**

Prezada Professora Doutora Kátia Sabrina Paludo e mestrando Rafael Inácio Brandão:

Em relação à utilização de animais no projeto de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, do uso de 20 (vinte) ratos Wistar Fêmeas.  
**APROVADO.**

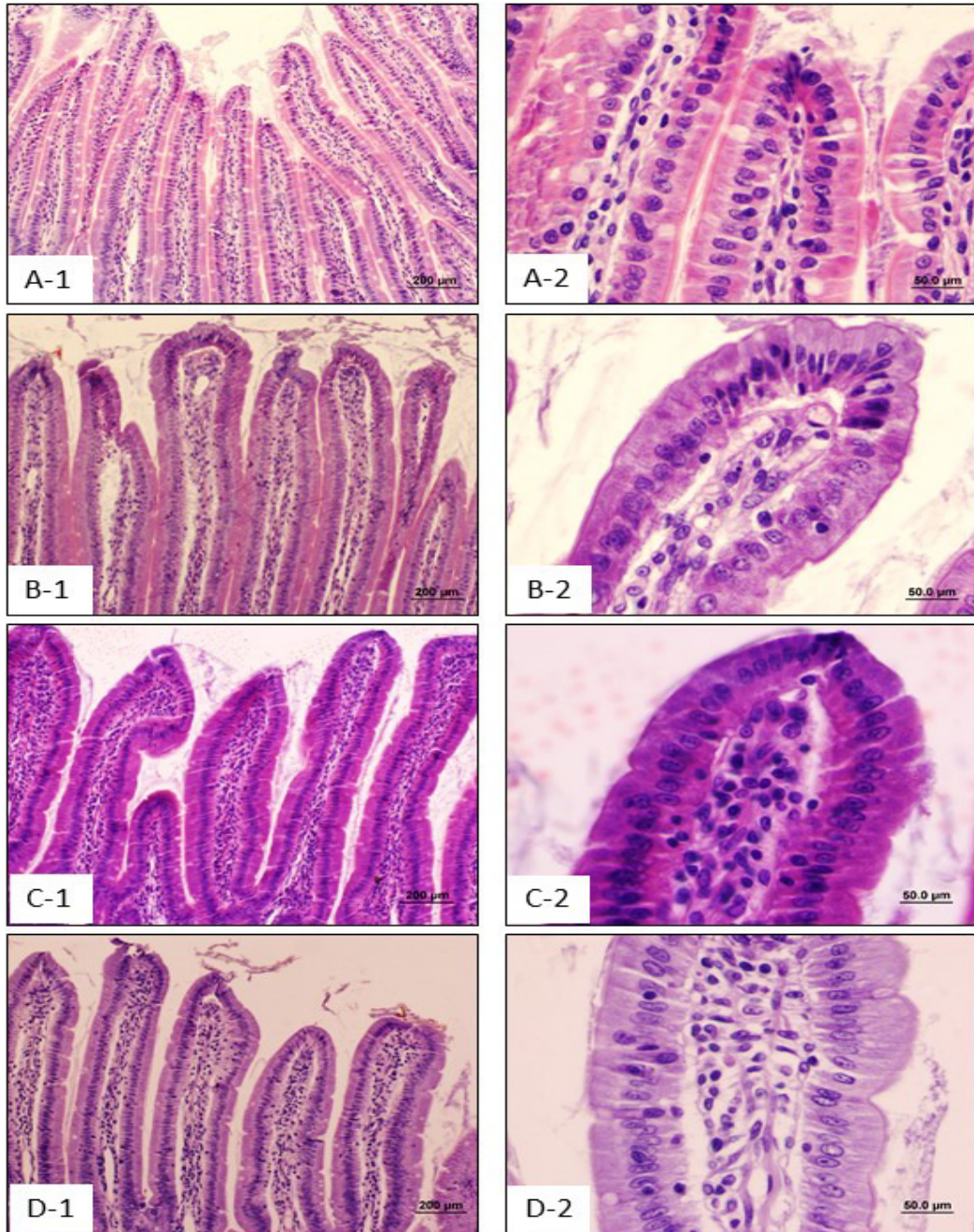
Atenciosamente,

  
Profª Draª Maria Marta Loddi  
**Coordenadora**

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP Fone: (042) 3220-3264

## 8.3 ANEXO C – PLANILHAS HISTOLÓGICAS

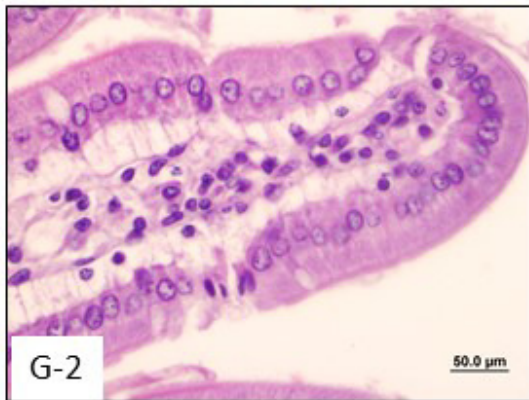
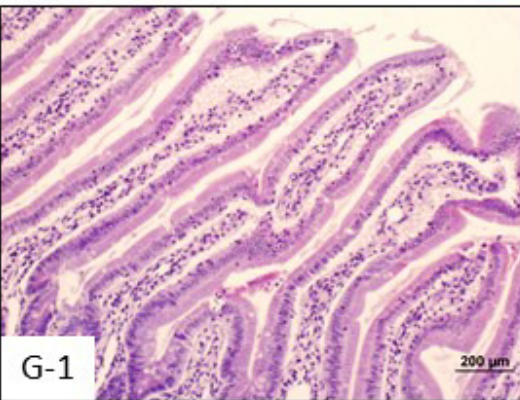
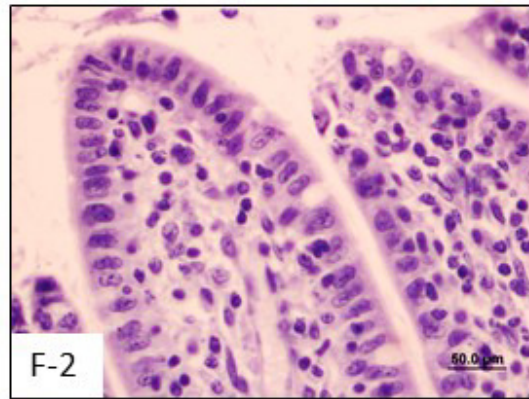
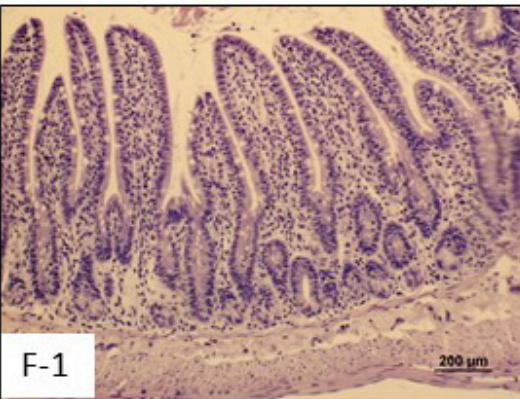
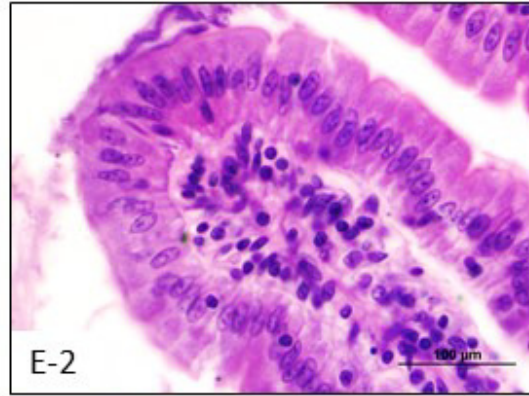
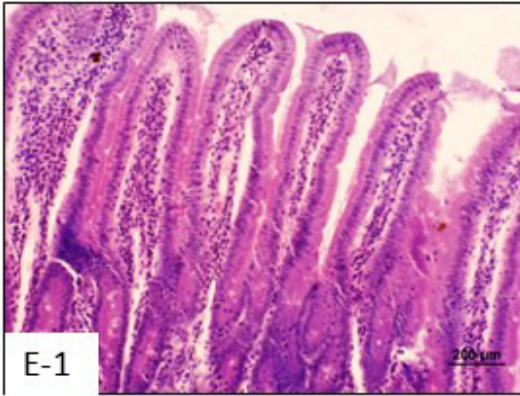
Imagens histológicas dos animais do grupo A – SHAM



Fonte: o autor

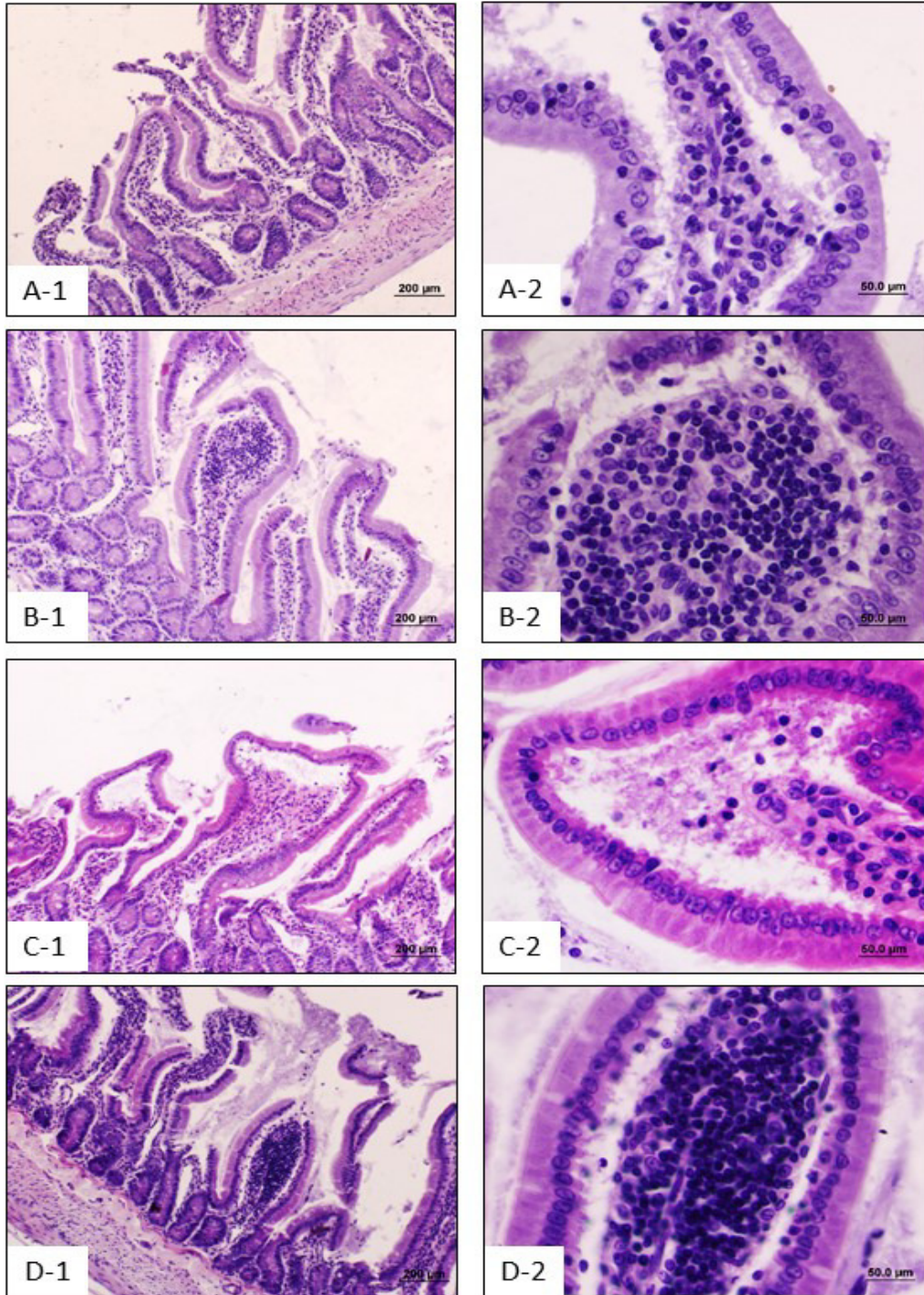
Nota: Segmentos intestinais ressecados, fixados e submetidos ao processamento histológico e coradas por hematoxilina-eosina. As letras referem-se aos diferentes animais. As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x.

Continuação...





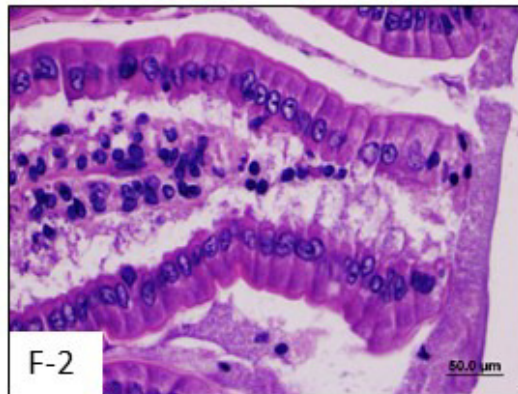
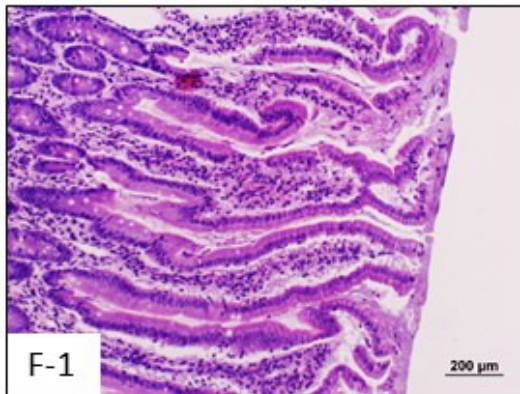
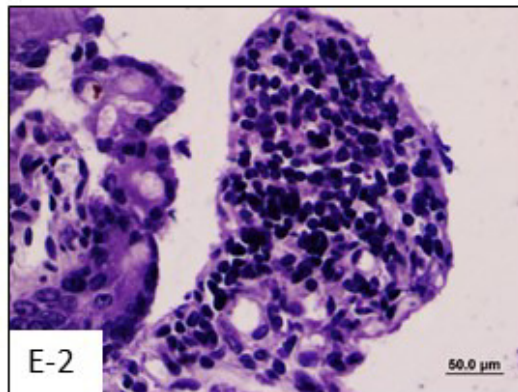
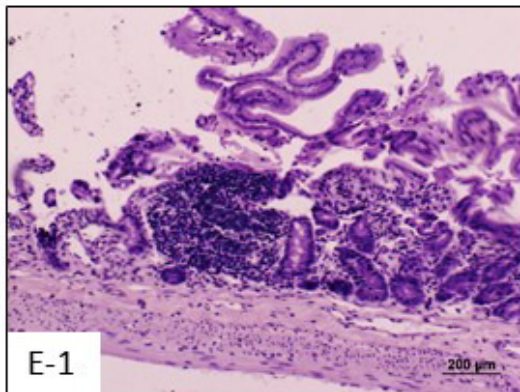
Imagens histológicas dos animais do grupo B – isquemia/reperfusão única.



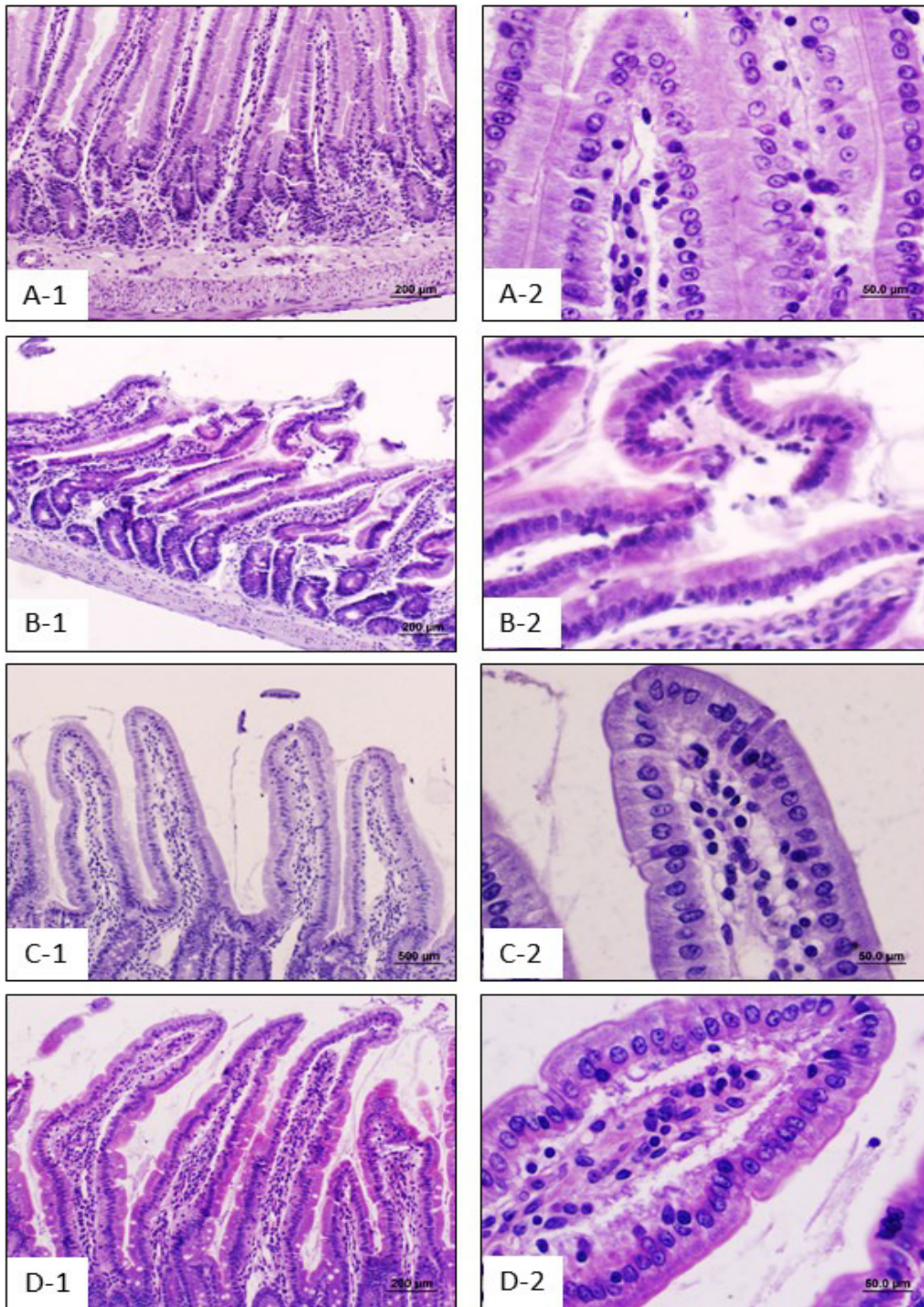
Fonte: o autor

Nota: Segmentos intestinais ressecados, fixados e submetidos ao processamento histológico e coradas por hematoxilina-eosina. As letras referem-se aos diferentes animais. As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x

Imagens histológicas dos animais do grupo B – isquemia/reperfusão única.  
Continuação...



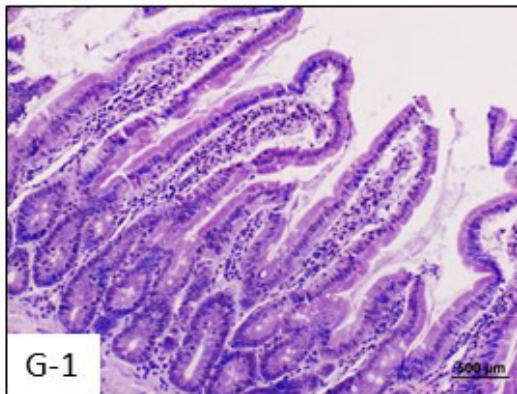
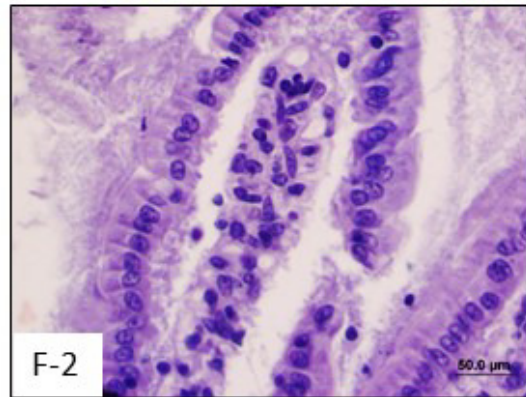
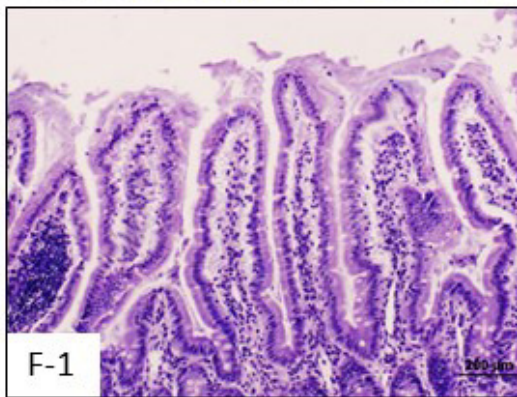
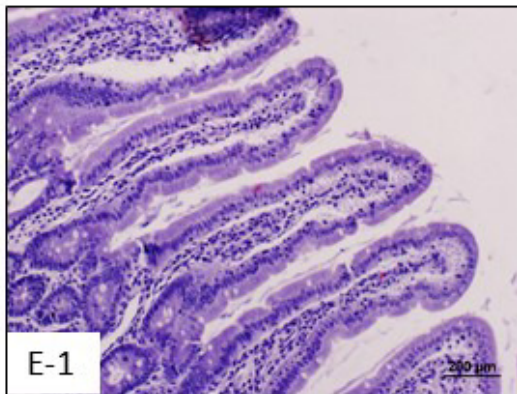
Imagens histológicas dos animais do grupo C – alopurinol/reperfusão única.



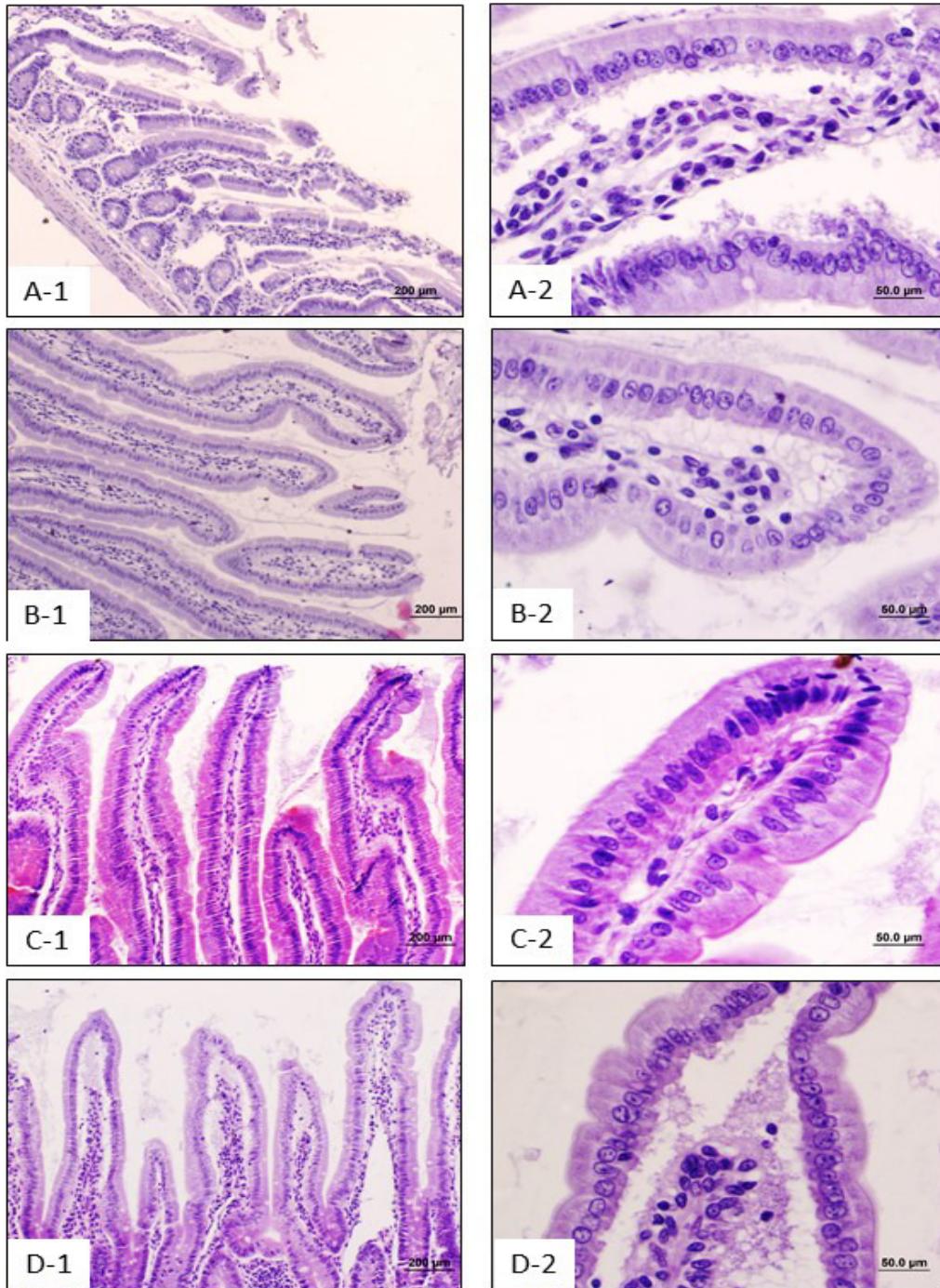
Fonte: o autor

Nota: Segmentos intestinais ressecados, fixados e submetidos ao processamento histológico e coradas por hematoxilina-eosina. As letras referem-se aos diferentes animais. As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x

Imagens histológicas dos animais do grupo C – alopurinol/reperfusão única.  
Continuação...



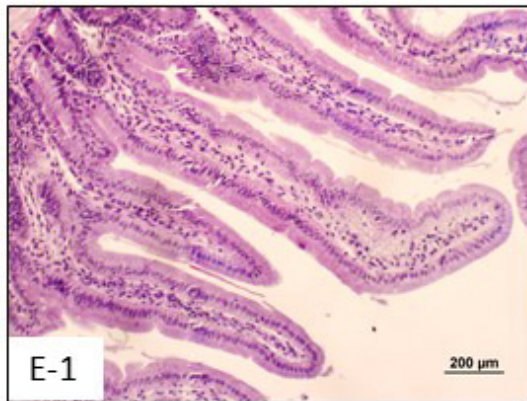
Imagens histológicas dos animais do grupo D – isquemia/reperfusão repetida.



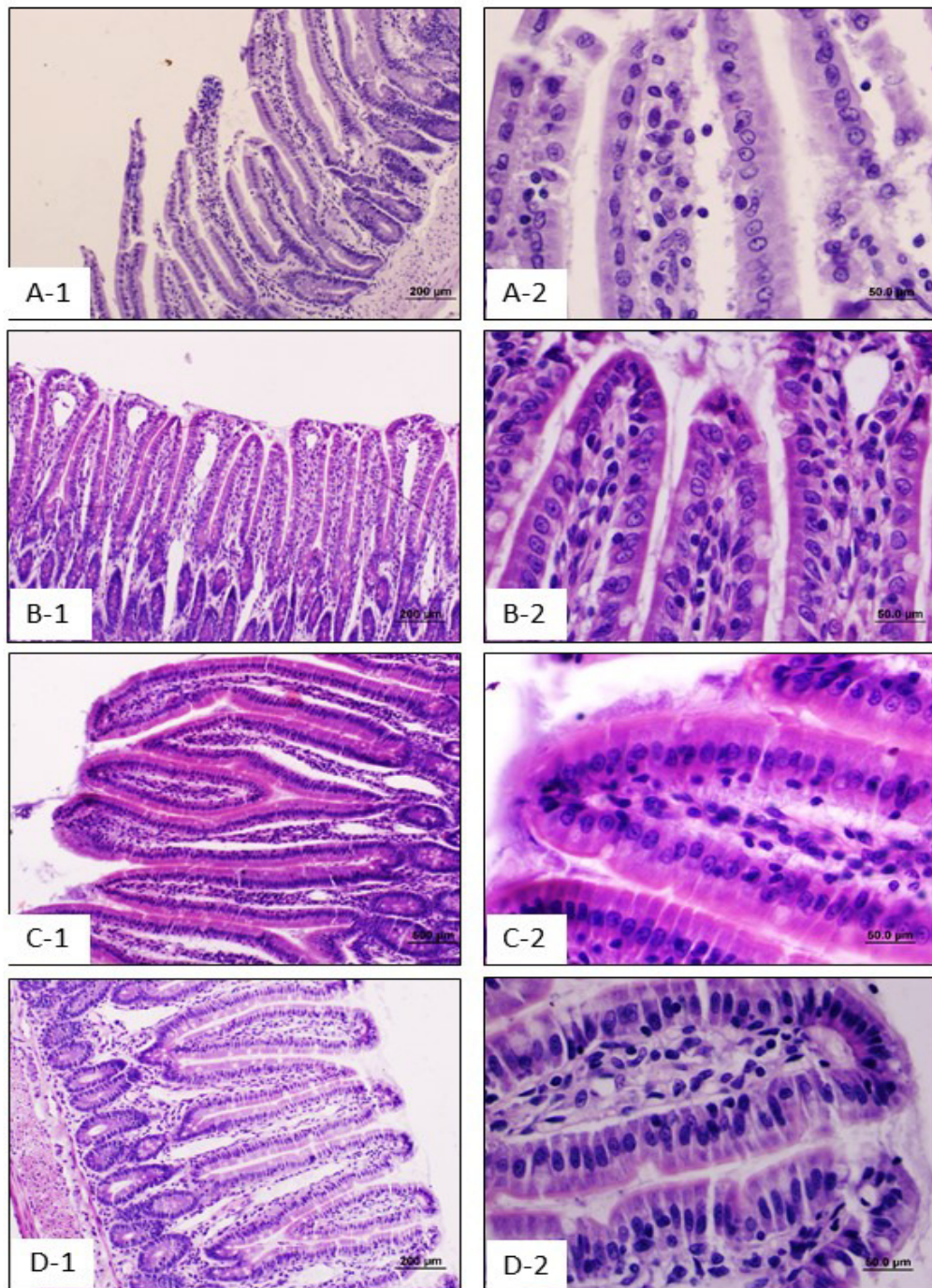
Fonte: o autor

Nota: Segmentos intestinais ressecados, fixados e submetidos ao processamento histológico e coradas por hematoxilina-eosina. As letras referem-se aos diferentes animais. As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x

Imagens histológicas dos animais do grupo D – isquemia/reperfusão repetida.  
Continuação...



Imagens histológicas dos animais do grupo E – Alopurinol/isquemia/reperfusão repetida.



Fonte: o autor

Nota: Segmentos intestinais ressecados, fixados e submetidos ao processamento histológico e coradas por hematoxilina-eosina. As letras referem-se aos diferentes animais. As imagens identificadas pelo número 1 apresentam aumento de 100x e as pelo número 2 de 400x

Imagens histológicas dos animais do grupo E – Alopurinol/isquemia/reperfusão repetida. Continuação...

