



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

RATOS WISTAR SUBMETIDOS À REPERFUSÃO DE 24H APÓS ISQUEMIA INTESTINAL NÃO APRESENTAM ALTERAÇÃO NA DENSIDADE GERAL DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS

Camila Quaglio Neves¹; Stephanie Carvalho Borges²; Nilza Cristina Buttow³

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PBC), Universidade Estadual de Maringá. Maringá - PR.
camila_neves76@hotmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PBC), Universidade Estadual de Maringá - PR.
stephaniecarvalhoborges@hotmail.com

³Orientadora, Pós-doutora. Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá. Maringá - PR.
ncbuttow@gmail.com

RESUMO

A isquemia e reperfusão intestinal está ligada à complicações de cirurgias, traumas, doenças inflamatórias e outras. Na isquemia ocorre o bloqueio do fluxo sanguíneo intestinal. Durante a reperfusão, o aumento repentino da concentração de oxigênio causa uma cascata de reações promovendo estresse oxidativo e dano celular que pode resultar em disfunção intestinal. Dessa forma, o objetivo foi avaliar o efeito da isquemia e reperfusão intestinal sobre a população geral de neurônios entéricos. Ratos Wistar foram divididos em 3 grupos: controle (C), operados sem isquemia (Sham) e operados com oclusão da artéria mesentérica superior (IR). A isquemia foi realizada por um clamp microvascular e amarrações laterais por 45 minutos seguida de 24 horas de reperfusão. O plexo mientérico do íleo desses animais foi exposto e os neurônios positivos para HuC/D foram marcados por imunofluorescência. Todos os neurônios de 30 imagens foram contados. Não houve diferença significativa na densidade de neurônios entéricos entre os grupos. Nossos resultados demonstram que 45 minutos de isquemia e reperfusão de 24 horas não provocam alterações na população geral de neurônios mientéricos.

PALAVRAS-CHAVE: plexo mientérico, sistema nervoso entérico, Hu

1 INTRODUÇÃO

Os danos ao organismo relacionados a cirurgias e traumas que tem como consequência isquemia e reperfusão intestinal estão associados à grande morbidade e mortalidade de pacientes (MALLICK, 2004). Esta patologia pode ser resultado de embolia, trombose arterial ou venosa, trauma, insuficiência cardíaca, fármacos vasoativos, cirurgia aortoiliaca, arteriosclerose, displasia fibromuscular, doenças inflamatórias ou danos por radiação (HAGLUND, 1999)

Na isquemia ocorre o bloqueio total ou parcial do fluxo sanguíneo que chega ao intestino, sendo a artéria celíaca e artérias mesentérica superior e inferior, as mais comprometidas. Por bloquear o suporte de oxigênio que chega as células intestinais, a isquemia provoca alterações no metabolismo energético causando distúrbios na homeostase celular, processos que podem resultar em necrose celular (CERQUEIRA et al, 2005) e principalmente em apoptose (AN, 2005). Essa apoptose continua ocorrendo após horas de reperfusão (NODA *et. al.*, 1998).

O intestino e principalmente sua mucosa, é o órgão mais sensível à isquemia e reperfusão. (MALLICK, 2004) O dano que aparece durante a reperfusão de um tecido que sofreu previamente com a isquemia é maior do que o visto somente pela isquemia (CERQUEIRA et al, 2005; PARKS, 1986; MALLICK, 2004) A maior parte dos danos são causados pela isquemia, mas só se manifestam na reperfusão pelo aumento da pressão sanguínea e concentração de oxigênio (PARKS, 1986)

Nos segmentos intestinais submetidos à isquemia e reperfusão, o número total de neurônios mientéricos gradualmente diminui durante o período de reperfusão. Essa perda neuronal pode resultar em disfunção intestinal, tendo em vista que a motilidade e a secreção são altamente dependentes da atividade desses neurônios entéricos (LINDERSON et al, 2004)



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

O impacto econômico gerado por pacientes que sofrem de isquemia mesentérica crônica sintomática é significativo. Parâmetro que se agrava por englobar diagnóstico e tratamento, que muitas vezes inclui cirurgia e conta com complicações associadas de 20 a 40% dos pacientes. Além disso, com o aumento da população mundial e o aumento da idade média da população, os casos tendem a aumentar (CHANDRA, 2010)

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de 45 minutos de isquemia e 24 horas de reperfusão intestinal sobre a população geral de neurônios mientéricos no íleo de ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido a aprovação do CEUA/UEM nº6265010416. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos, com peso corporal entre 230g e 250g foram divididos em três grupos: não operado (C), submetido à cirurgia mas sem oclusão da artéria mesentérica superior (MAS) (Sham) e submetido à cirurgia com oclusão da AMS (IR). Esses animais foram alojados no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM e receberam ração padrão NUVILAB® e água *ad libitum*. Permaneceram em temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação controladas (ciclo claro escuro 12/12h).

Os animais passaram por jejum de 15 horas antes do procedimento cirúrgico. Todos foram anestesiados via intramuscular com xilazina® (20mg/kg de peso corporal) + ketamina® (100mg/kg de peso corporal). Os grupos Sham e IR sofreram laparotomia abdominal. Os animais do grupo Sham somente tiveram seus intestinos expostos. O grupo IR sofreu isquemia de 45 minutos estabelecida pela oclusão da AMS através de um clamp microvascular e do bloqueio da irrigação lateral por amarrações. Após o tempo de isquemia, as amarrações e o clamp foram retirados e o abdômen suturado.

Passadas 24 horas de reperfusão, a eutanásia foi realizada com dose letal (100mg/kg de peso corporal) de Tiopental Sódico® e o íleo delimitado pela isquemia foi coletado. O segmento foi lavado em Tampão Fosfato de Sódio 0,1M pH7,4 em fixado em Paraformaldeído 4% pH7,4. O intestino foi aberto na borda mesentérica e dividido em segmentos menores. Um segmento foi dissecado sob estereomicroscópio para obtenção de preparados totais da túnica muscular.

Os preparados totais foram submetidos à técnica imunohistoquímica para marcação da população geral de neurônios mientéricos com utilização de anticorpos primário anti HuC/D (mouse, Invitrogen) e secundário anti-mouse (Alexa Fluor 488, Invitrogen).

A análise quantitativa foi realizada pela amostragem do preparado total através de imagens capturadas em microscópio de fluorescência. Foram contados todos os neurônios presentes em 30 imagens capturadas em objetiva de 20x. A análise estatística realizada foi Oneway ANOVA seguida de pós-teste de Tukey com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. O valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que 45 minutos de isquemia e 24 horas de reperfusão não provocam redução na densidade de neurônios mientéricos imunorreativos a proteína HuC/D no íleo de ratos (figura 1). A imunomarcação para população geral de neurônios (Hu C/D) pode ser observada na Figura 2.

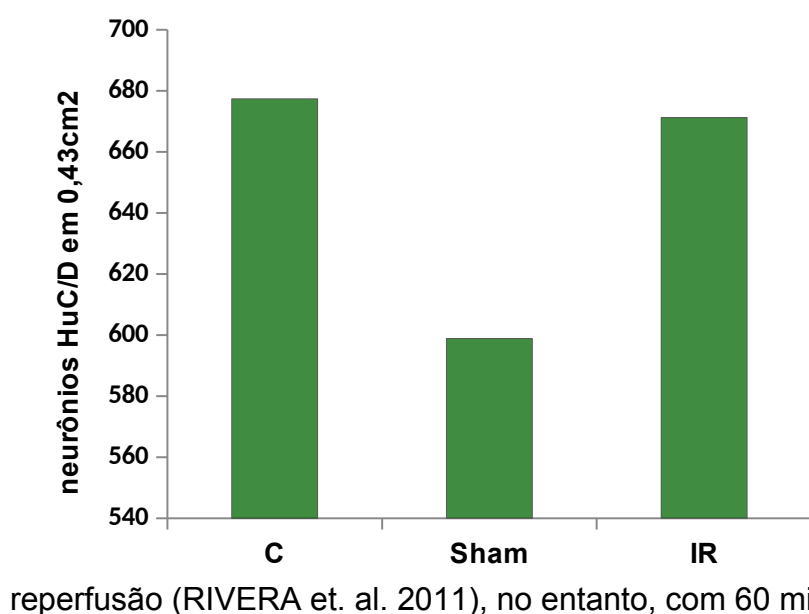


Figura 1: Densidade de neurônios mientéricos imunoreativos para a proteína HuC/D do íleo de ratos submetidos a isquemia e reperusão.

Nossos resultados estão de acordo com o encontrado por Lindeström e Ekblad (2004) que com 24 horas de reperusão não encontraram diferença estatística no número de neurônios do plexo mientérico. Segundo estes autores, a diminuição da densidade, comparada ao grupo Sham só foi significativa após 1 semana de reperusão. Outros estudos demonstram pela técnica de TUNEL que a perda neuronal inicia-se após 6 horas de

reperusão (RIVERA et. al. 2011), no entanto, com 60 minutos de isquemia. .

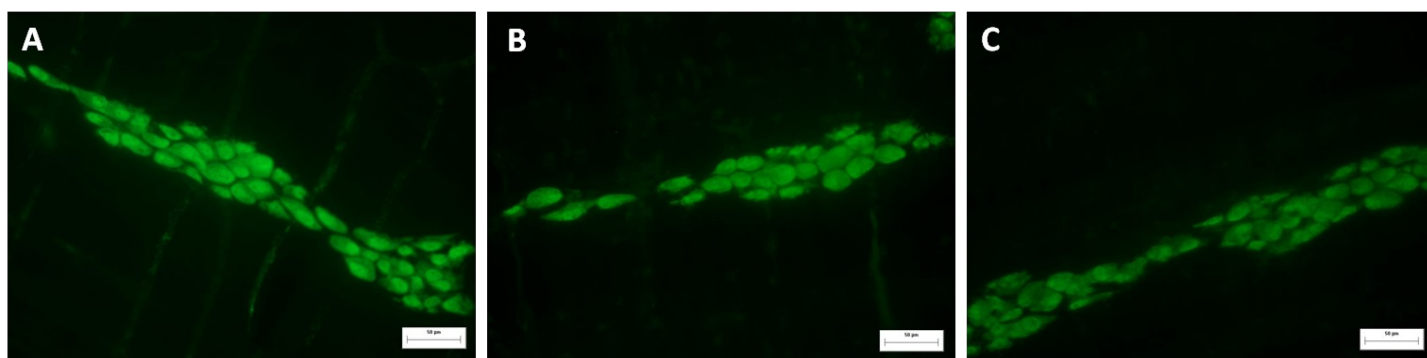


Figura 2: População geral de neurônios mientéricos do íleo de ratos, obtida pela técnica de imunofluorescência para HuC/D. Objetiva 20x. Barra de escala 50µm. A: grupo controle; B: grupo Sham e C: grupo IR.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados indicam que 45 minutos de isquemia e 24 horas de reperusão intestinal, não provocam alterações na densidade neuronal geral do plexo mientérico de ratos *Wistar*.

REFERÊNCIAS

AN, S.; HISHIKAWA, Y.; KOJI, T. Induction of cell death in rat intestine by ischemia reperfusion: differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax systems depending upon cell types. **Histochemistry and Cell Biology**, 2005. 123: 249-261.

CERQUEIRA NF, HUSSNI CA, YOSHIDA WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir Bras**. 2005 Jul-Aug;20(4).



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

CHANDRA, A.; QUINONES-BALDRICH, W. J. Chronic mesenteric ischemia: How to select patients for invasive treatment. **Seminars in Vascular Surgery**, 2009. 21-28.

HAGLUND, ULF; BERGQVIST, DAVID. Intestinal ischemia – the basics. **Langenbeck's Archives of Surgery**, 1999.384, 233-238.

LINDERSTRÖM L-M, EKBLAD E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. **Digestive diseases and Sciences**. 2204 August; 49; 1212-1222.

MALLICK, I. H.; YANG, W.; WINSLET, M. C.; SEIFALIAN, A. Ischemia-Reperfusion injury os the intestine and protective strategies against injury. **Digestive Diseases and Sciences**, 2004. 49: 1359-1377

NODA T, IWAKIRI R, FUJIMOTO K, MATSOU S, AW TY: Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. **Am J Physiol** 274:G270–G276, 1998

PARKS, D. A.; GRANGER, N. Contributions of inchemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology** 250.6 (1986): G749-G753.

RIVERA, L. R.; THACKER, M.; PONTELL, L.; CHO, H. .; FURNESS, J. B. Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. **Cell and Tissue Research** 2011. 344:111-123.