

TERESINHA REGINA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**EFEITO DA PENTOXIFILINA E DO PRECONDICIONAMENTO
ISQUÊMICO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM
RATOS: ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOMOLECULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional para obtenção do título acadêmico de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

TERESINHA REGINA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**EFEITO DA PENTOXIFILINA E DO PRECONDICIONAMENTO
ISQUÊMICO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM
RATOS: ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOMOLECULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional para obtenção do título acadêmico de Doutor em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Murched Omar Taha

São Paulo

2016

Oliveira, Teresinha Regina Ribeiro

Efeito da pentoxifilina e do condicionamento isquêmico na isquemia e reperfusão intestinal em ratos: estudo morfológico e biomolecular.

/ Teresinha Regina Ribeiro de Oliveira. - São Paulo, 2016.
xx, f.64

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Effect of Pentoxifylline and Ischemic Preconditioning on Ischemic and Reperfusion of Intestine in rats: study morphologic and biomolecular

1. Pentoxifilina. 2. Isquemia e reperfusão 3. Precondicionamento isquêmico. 4. Óxido Nítrico. 5. Intestino delgado.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TRANSLACIONAL**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Teresa Zanella

Coordenadora do Curso: Profa.Dra. Dulce Elena Casarini



Serviço Público Federal
Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Câmara de Pós-Graduação e Pesquisa



ATA DA REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos dez dias do mês de maio de dois mil e dezesseis, reuniu-se no anfiteatro Flávio da Fonseca, às 13:00, a Comissão Julgadora para a DEFESA DE TESE DE DOUTORADO, solicitada por TERESINHA REGINA RIBEIRO DE OLIVEIRA, aluna do Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional, que apresentou a tese sob o título: EFEITO DA PENTOXIFILINA E DO PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS: ESTUDO MORFOLÓGICO E BIOMOLECULAR

Profa. Dra. CHRISTIANE INOCÊNCIO VASQUES- Professora Adjunta - Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Prof. Dr. DJALMA JOSÉ FAGUNDES – Professor Titular e Livre Docente – Disciplina Técnica Operatória e Cirurgia Experimental – Universidade Federal de São Paulo;

Prof. Dr. ITAMAR SOUZA DE OLIVEIRA JUNIOR – Professor Visitante- Disciplina de Anestesiologia- Universidade Federal de São Paulo.

Profa. Dra. MARIÂNGELA RIBEIRO RESENDE – Professora Assistente- Departamento de Clínica Médica- Universidade Estadual de Campinas;

Prof. Dr. MURCHED OMAR TAHA – Professor Associado, Livre Docente e Chefe da Disciplina Técnica Operatória e Cirurgia Experimental - Universidade Federal de São Paulo.

O Presidente Prof. Dr. MURCHED OMAR TAHA, inicia a sessão dando a palavra à candidata, que dispõe de um período entre trinta a cinquenta minutos para expor sua tese. A seguir dá a palavra aos Professores para arguição. Cada examinador(a) dispõe de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como a candidata para as respostas. Tendo a candidata respondido todas as arguições em tempo hábil os membros da Banca examinadora emitiram seus pareceres:

Profs. Drs.:

CHRISTIANE INOCENCIO VASQUES, Aprovada Vasques
DJALMA JOSÉ FAGUNDES, Aprovada Djalma
ITAMAR SOUZA DE OLIVEIRA-JÚNIOR, Aprovado Itamar
MARIANGELA RIBEIRO RESENDE, Aprovado Mariangela
MURCHED OMAR TAHA, Aprovado Murched

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera o(a) Sr(a) TERESINHA REGINA RIBEIRO DE OLIVEIRA habilitado(a) a receber o título de DOUTOR EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO . E por estarem de acordo, assinam a presente ata. São Paulo, terça-feira, 10 de maio de 2016.

Djalma
Prof. Dr. DJALMA JOSÉ FAGUNDES

Itamar
Prof. Dr. ITAMAR SOUZA DE OLIVEIRA JUNIOR

Murched
Prof. Dr. MURCHED OMAR TAHA

Vasques
Profa. Dra. CHRISTIANE INOCENCIO VASQUES

Mariangela
Profa. Dra. MARIANGELA RIBEIRO RESENDE

Ao meu marido, Geraldo Ferreira, pela contribuição profissional, pelo esteio nos momentos difíceis, por sempre acreditar que sou capaz de traçar novos caminhos.

Ao meu filho Henrique Ribeiro Oliveira, orgulho da minha vida, íntegro, justo, um jovem que, na atualidade, respeita os valores morais.

Ao meu filho Rubens Ribeiro Oliveira (*in memoriam*), que amou a vida intensamente, que sempre acreditou no agora, que o importante é ser feliz...

Ao meu pai, Rubens Ribeiro, exemplo de perseverança, escritor aos 70 anos, premiado, que com toda sapiência definiu: “o difícil é fazer o simples”.

À minha mãe, Terezinha Faim, por ensinar que a delicadeza do silêncio e do sorriso são mais importantes que as palavras.

À minha querida irmã Mary-Aroon, exemplo de luz nas adversidades.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Professor Dr. Murched Omar Taha, professor associado e livre docente, por acreditar na minha pessoa, pelo respeito, paciência e tolerância.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, professora Livre Docente, afiliada da disciplina de Nefrologia e coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Escola Paulista de Medicina (EPM), pela exímia condução e dedicação ao programa e em especial pelo apoio.

À Profa. Dra. Analy Salles de Azevedo Melo, professora afiliada da disciplina de Infectologia e vice coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Medicina Translacional da UNIFESP-EPM, pela imprescindível dedicação ao programa e em especial pela compreensão e prestimosa assistência.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Translacional da UNIFESP-EPM, pela dedicação e competência didática em realizar um excelente trabalho com a diversidade de formações.

À Profa. Dra. Caden Souccar, professora Titular, Livre Docente e Chefe do Departamento de Farmacologia da UNIFESP-EPM, pelo acolhimento generoso em seu laboratório de farmacologia para orientação e manipulação do fármaco.

Ao Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões, professor Titular e Livre Docente do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP-EPM, pela colaboração e orientação na análise histológica e imuno-histoquímica.

À direção do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol)- Departamento de Bioquímica/ UNIFESP, pelo apoio e cedência do espaço para execução do Reação em Cadeia Polimerase com transcrição reversa em tempo real.

À Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero, professora Livre Docente do departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM, pela atenção e orientação dos procedimentos microcirúrgicos.

Ao Dr. Roberto Falzoni, médico patologista e diretor do Serviço da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela contribuição e orientação na elaboração da técnica imuno-histoquímica.

As Sras: Elaine Maria Alves Bazzi Dantas, Benedita Salete Costa Lima e Adriana Alves Bazzi Pedreira, secretarias da disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental EPM-UNIFESP, pelo apoio logístico e agradável convivência durante a confecção deste trabalho.

A biomédica, Maria do Carmo Gonçalo, técnica do Instituto Nacional de Farmacologia da UNIFESP-EPM, pela recepção calorosa no laboratório de farmacologia e disponibilidade de fazer o acompanhamento para qualidade da diluição do fármaco.

À Pós-Graduanda da EPM-UNIFESP, Suellen Maurin Feitosa, por toda gentileza, amizade e imensurável apoio durante a pesquisa, no preparo e análise das amostras pela biologia molecular.

Ao biólogo, Paulo Cesar Simões Silva, técnico do CTCMol-Departamento de Bioquímica/UNIFESP, pela orientação na confecção da técnica histológica.

Ao químico, José Lúcio Soriano, técnico do biotério da disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental EPM-UNIFESP, pela amizade e contribuição de seus conhecimentos na manipulação dos animais de pequeno porte.

Aos alunos da Escola Paulista de Medicina e Iniciação Científica do Departamento de Cirurgia – UNIFESP, Wesley Guedes Sava Bonservizi e Rafael Saurim Coquim, pelo incondicional apoio nos procedimentos cirúrgicos.

Ao estagiário do Departamento de Cirurgia – UNIFESP/EPM, Eduardo Hiroshi Tikazawa, aluno da Faculdade de Medicina de Marília, pelo suporte técnico, generosidade e companheirismo durante a execução dos procedimentos cirúrgicos.

A todos que, mesmo não citados especificamente, estiveram presentes para ajudar a tornar um sonho em realidade.

SUMÁRIO

Lista de figuras	xi
Lista de gráficos	xiii
Lista de tabelas	xiv
Lista de quadros.....	xv
Lista de abreviaturas e símbolos	xvi
Resumo	xix
Abstract	xx
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	07
2.1 Objetivo geral	07
2.2 Objetivos específicos	07
3 MÉTODOS	08
3.1 Amostra	08
3.2 Procedimentos	09
3.2.1 Procedimento anestésico	09
3.2.2 Procedimento operatório	10
3.2.3 Administração de agentes farmacológicos	13
3.3 Análise histológica	13
3.3.1 Avaliação do escore de lesão da mucosa do jejuno	14
3.3.2 Morfometria da espessura da parede intestinal	15
3.4 Análise imuno-histoquímica	15
3.5 Reação em cadeia polimerase com transcrição reversa em tempo real	18
3.6 Análise Estatística	20
3.6.1 Metodologia de leitura dos dados RT-PCR em tempo real	20
3.6.2 Descrição da análise estatística dos resultados	20
4 RESULTADOS	22
4.1 Análise morfológica do tecido intestinal	22
4.1.1 Análise histológica do escore de lesão de jejuno	22
4.1.2 Análise do comprimento das vilosidades (µm)	28
4.1.3 Análise do comprimento das criptas (µm)	32
4.2 Análise imuno-histoquímica	34
4.2.1 Análise do escore das células reativas ao anticorpo da caspase-3 ativada	34

4.2.2	Análise do escore das células reativas ao anticorpo da Bcl-2	38
4.3	Análise molecular: RT- PCR em tempo real.....	42
4.3.1	Análise RT-qPCR da expressão de NOS2	42
4.3.2	Análise RT-q PCR da expressão de NOS3	44
5	DISCUSSÃO	46
5.1	Aspectos do estudo	46
5.2	Morfologia do tecido intestinal	47
5.2.1	Histologia da lesão do jejuno	47
5.2.2	Estrutura da mucosa intestinal	48
5.3	Imuno-histoquímica	49
5.3.1	Reatividade a anticaspase-3 ativada	49
5.3.2	Reatividade a antiproteína Bcl-2	50
5.4	Expressão de NOS2 (iNOS)	51
5.5	Expressão de NOS3 (eNOS)	52
6	CONCLUSÃO	55
7	REFERÊNCIAS	56
ANEXOS		
APÊNDICE		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de distribuição dos animais nos grupos de estudo	9
Figura 2 -	Foto mostrando: (A) Laparotomia mediana longitudinal 4 cm; (B) Exposição do intestino do rato	10
Figura 3 -	Foto da identificação e isolamento da artéria mesentérica superior ...	11
Figura 4 -	Foto da colocação do clampe vascular microcirúrgico	11
Figura 5 -	Foto mostrando: (A) artéria mesentérica isquêmica, (B) após retirada do clampe	12
Figura 6 -	Esquema do tempo do procedimento IR 90 minutos	12
Figura 7 -	Esquema do tempo do procedimento PCI 10 minutos e IR 90 minutos	12
Figura 8 -	Fotomicrografia do parâmetro utilizado para mensuração da parede intestinal	15
Figura 9 -	Fotomicrografia do parâmetro utilizado para contagem semiquantitativa de células imunoreativas a anticaspase-3 ativada (A) e ao anticorpo Bcl-2 (B)	17
Figura 10 -	Fotomicrografia da eletroforese em gel, observação conclusiva da extração de RNA das amostras	18
Figura 11 -	Fotomicrografia: Aspecto microscópico das alterações histológicas do procedimento controle (simulado)	22
Figura 12 -	Fotomicrografia Aspecto microscópico das alterações histológicas do procedimento isquemia, reperfusão e solução salina	23
Figura 13 -	Fotomicrografia: Aspecto microscópico das alterações histológicas do procedimento isquemia, reperfusão e pentoxifilina	24
Figura 14 -	Fotomicrografia: Aspecto microscópico das alterações histológicas do procedimento condicionamento, isquemia, reperfusão e solução salina	25
Figura 15 -	Fotomicrografia: Aspecto microscópico das alterações histológicas do procedimento condicionamento isquêmico, isquemia, reperfusão e pentoxifilina	26
Figura 16 -	Fotomicrografia da mensuração das vilosidades e criptas do grupo	

	simulado	29
Figura 17 -	Fotomicrografia da mensuração das vilosidades e criptas do grupo isquemia, reperfusão e solução salina.....	29
Figura 18 -	Fotomicrografia da mensuração das vilosidades e criptas do grupo isquemia, reperfusão e pentoxifilina.....	30
Figura 19 -	Fotomicrografia da mensuração das vilosidades e criptas do grupo condicionamento isquêmico, isquemia, reperfusão e solução salina	30
Figura 20 -	Fotomicrografia da mensuração das vilosidades e criptas do grupo condicionamento isquêmico, isquemia, reperfusão e pentoxifilina ..	31
Figura 21 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento simulado da reação imuno-histoquímica da caspase-3 ativada.....	34
Figura 22 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento IRss pela reação imuno-histoquímica da caspase-3 ativada.....	35
Figura 23 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento IRptx pela reação imuno-histoquímica da caspase-3 ativada	35
Figura 24 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento PCI_IRss pela reação imuno-histoquímica da caspase-3 ativada	36
Figura 25 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento PCI_IRptx da reação imuno-histoquímica da caspase-3 ativada.....	36
Figura 26-	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento simulado da reação imuno-histoquímica da Bcl-2	39
Figura 27 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento IRss pela reação imuno-histoquímica da Bcl-2	39
Figura 28 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento IRptx pela reação imuno-histoquímica da Bcl-2.....	40
Figura 29 -	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento PCI_IRss pela reação imuno-histoquímica da Bcl-2.....	40
Figura 30-	Fotomicrografia do aspecto microscópico do procedimento PCI_IRptx pela reação imuno-histoquímica da Bcl-2	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1 - Média do escore de lesão segundo Chiu e intervalo de confiança de 95% para a média ...	28
Gráfico 2 - Média da mensuração das vilosidades (μm) e intervalo de confiança de 95% para a média	32
Gráfico 3 - Média de mensuração das criptas (μm) e intervalo de confiança de 95% para a média	33
Gráfico 4 - Média dos escores das células reativas a anticaspase-3 ativada nos procedimentos e intervalo de confiança de 95% para a média	38
Gráfico 5 – Médias dos escores das células reativas ao anticorpo Bcl-2 nos procedimentos e intervalo de confiança de 95% para a média	42
Gráfico 6 - Média ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) da expressão de NOS2 nos tratamentos e intervalo de confiança de 95%	44
Gráfico 7 - Média ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) da expressão de NOS3 nos tratamentos e intervalo de confiança de 95% para a média	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela 1- Subfamílias da Bcl-2 de acordo com a estrutura (domínio) e função	4
Tabela 2 - Indicação do número no banco de genes	19
Tabela 3 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e análise de variância para os escores médios de lesão em tecido intestinal de rato	27
Tabela 4 - Comparações múltiplas para o fator tratamento entre os escores médio da lesão intestinal com correção de Bonferroni	27
Tabela 5 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e análise de variância para medidas das vilosidades do tecido intestinal de rato.....	31
Tabela 6 - Comparações múltiplas para o fator tratamento entre os valores médios das vilosidades com correção de Bonferroni	32
Tabela 7 - Média, erro padrão, intervalo de confiança por fator e análise de variância das criptas do tecido intestinal de rato.....	33
Tabela 8 - Média, erro padrão e intervalo de confiança e teste de Kruskal-Wallis para os escores médios encontrados para as células reativas à anticaspase-3 ativada.....	37
Tabela 9 - Comparações múltiplas para o fator tratamento das células reativas à anticaspase-3 ativada com correção de Bonferroni	37
Tabela 10 - Média, erro padrão e intervalo de confiança 95% por fator e teste Kruskal-Wallis para os escores médios para as células reativas a antiproteína Bcl-2	41
Tabela 11 - Média, erro padrão, intervalo de confiança e análise da variância do valor médio $2^{-\Delta\Delta CT}$ da expressão de NOS2.....	43
Tabela 12 - Comparações múltiplas com correção de Bonferroni do valor médio da expressão de NOS2.....	43
Tabela 13 - Média, erro padrão e intervalo de confiança e análise da variância do valor médio $2^{-\Delta\Delta CT}$ da expressão de NOS3.....	44
Tabela 14 - Comparações múltiplas entre os grupos para a média de $2^{-\Delta\Delta CT}$ da expressão de NOS3.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escore de lesão da mucosa do jejuno	14
Quadro 2 - Escore da reação imuno-histoquímica	17

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Serina treonina cinase ou proteína cinase B
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
APCLab	Laboratório de Apoio em Patologia Cirúrgica
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	ATP sintase
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i> (pró-apoptótica)
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer</i> (pró-apoptótica)
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i> (pró-apoptótica)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i> (anti-apoptótica)
Bcl-x	Bcl-2 like 1 ou Bcl-X (anti-apoptótico)
BH1	Domínio 1 de homologia com a Bcl- 2
BH2	Domínio 2 de homologia com a Bcl- 2
BH3-apeenas	Subfamília das proteínas “BH3-apeenas” (Bad, Bid, Bim, Puma e Noxa) – domínio pro-apoptótico
BH3	Domínio 3 de homologia com a Bcl-2
BH4	Domínio 4 de homologia com a Bcl- 2
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i> (pró-apoptótica)
BMF	Fator modificador da Bcl-2
Bim	<i>Bcl-2 inhibitory molecule</i>
BSA	Albumina de soro bovino
°C	Grau Celsius
Ca⁺⁺	Íon cálcio
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Ct	Ciclo limiar
CTCMol	Centro de Terapia Celular e Molecular
DAMPS	Moléculas de Padrão de Reconhecimento ao Dano Molecular
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	Desoxirribonuclease trifosfato
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial ou NOS 3
EPM	Escola Paulista de Medicina
ER	Espécies reativas
ERNS	Espécies reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FADD	Proteína associada ao domínio de morte (Fas)
FAS	Receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose
GAPDH	Gliceraldeído- 3-fosfato desidrogenase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutathiona peroxidase
H.E.	Hematoxilina e eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HONO₂	Ácido peróxido nitroso
HRK	Harakiri
I	Isquemia
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-18	Interleucina-18
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida ou NOS 2
IP3	1,4,5 Trifosfato de inosina
IR	Isquemia e reperfusão
IV	Endovenoso
K⁺	Íon Potássio
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil-éster
μL	Microlitro
mRNA	RNA mensageiro
Na⁺	Íon sódio
NADPH	Adenosina nicotinamida dinucleotídeo fosfato oxidase
NFκ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico

NO₂	Nitritos
NOS	Óxido nítrico sintase
NOXA	<i>Phorbol - 12 - myristate-13 – acetate – induced protein 1</i>
OH•	Hidroxila
ONO₂•	Peroxinitrito
O₂	Oxigênio
O₂•⁻	Superóxido
PCI	Precondicionamento isquêmico
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3-K	Cinase dependente de 3 fosfatidilinositol (Fosfatidilinositol 3-OH kinase)
PTK	Proteína tirosina cinase (fosforilação)
PTX	Pentoxifilina
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RIPK	Proteína quinase de interação com receptor
RO•	Alcoxila
ROO•	Peroxila
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	Superóxido dismutase
SS	Solução salina 0,9%
TCR	Receptores de células T
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIF	Domínio-TIR contendo adaptador indutor do Interferon-β
TIR	Tirosina
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
XDH	Xantina desidrogenase

RESUMO

Objetivo. Investigar as evidências histológicas, imuno-histoquímicas e moleculares em intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, tratados pelo condicionamento isquêmico e com pentoxifilina. **Métodos:** Foi utilizada uma amostra de 30 ratos EPM-1 Wistar distribuídos em 5 grupos, dos quais utilizou-se o clampamento da artéria mesentérica superior para os procedimentos de isquemia e reperfusão. Os grupos foram compostos por 6 ratos denominados: Simulado (controle laparotomia); Isquemia e reperfusão (IR) com solução salina 0,9% (ss); isquemia e reperfusão com pentoxifilina (IRptx); condicionamento isquêmico (PCI) e isquemia e reperfusão com solução salina (PCI_IRss) e condicionamento isquêmico com isquemia e reperfusão e pentoxifilina (PCI_IRptx). Nos grupos IR promoveu-se isquemia de 30 minutos e reperfusão de 60 minutos. O tempo utilizado na PCI_IR, foi 5 minutos de isquemia e 5 minutos de reperfusão com IR de 90 minutos. A pentoxifilina foi aplicada na dose de 80 mg/kg e a solução salina 0,9% (0,1mL/dose), 5 minutos antes da isquemia de 30 minutos. Retiraram-se segmentos do intestino delgado para estudo histológico (coloração H.E.), imuno-histoquímico e molecular. Foram utilizados na estatística, análise descritiva dos dados, análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis e teste *post hoc* Bonferroni. **Resultados:** O condicionamento isquêmico e pentoxifilina preservaram a estrutura celular epitelial das vilosidades intestinais. Não foi observada diferença entre as médias do escore de lesão PCI_IRss e PCI_IR com pentoxifilina. Na imuno-histoquímica a caspase-3 apresentou reação mais intensa para IR com solução salina 0,9%. E a Bcl-2 foi positiva sem diferença significativa entre as médias dos procedimentos. Na análise molecular pela RT-PCR em tempo real observou-se: maior expressão estatisticamente significativa de iNOS em IRss e de eNOS no tratamento PCI e pentoxifilina. **Conclusões:** Os tratamentos pentoxifilina e PCI foram eficazes na preservação das células do intestino delgado submetido à isquemia e reperfusão. Quando associadas as estratégias, não houve sinergismo.

Descritores: Pentoxifilina; Isquemia e reperfusão; Condicionamento isquêmico; Óxido nítrico; Intestino delgado.

ABSTRACT

Objective: To investigate histological, immunohistochemistry and molecular changes in small intestine of rats submitted to ischemia and reperfusion, handled by ischemic preconditioning and pentoxifylline. **Methods:** It used a sample of 30 Wistar rats EPM-1, distributed in 5 groups, which used the superior mesenteric artery clamping to the procedures of ischemia and reperfusion. The groups were composed of 6 rats and named: Sham (laparotomy control); Ischemia and reperfusion with 0,9% saline (IRss); ischemia and reperfusion with pentoxifylline (IR_ptx); Ischemic preconditioning and ischemia and reperfusion with 0,9% saline solution (PCI_IR ss); Ischemic preconditioning and ischemia and reperfusion with pentoxifylline (PCI_IRptx). IR group ischemic time was 30 minutes and reperfusion 60 minutos. PCI time was 5 minutes ischemia and 5 minutes reperfusion to 90 minutes followed IR. The Pentoxifylline has been applied at a dose of 80 mg/kg and 0,9% saline solution (0,1 ml /dose), 5 minutes before ischemia of 30 minutes. Preconditioning groups, before the 30 minutes of ischemia, 5 minutes of ischemia and 5 minutes of reperfusion. Pulled out segments of the small intestine to a histological (staining), immunohistochemical and molecular. Were used in statistics, descriptive analysis of the data, analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test *pos hoc* – Bonferroni. **Results:** Ischemic preconditioning and Pentoxifylline preserved the intestinal villus epithelial cell structure. No difference was observed between the PCI and PCI with Pentoxifylline average score. In Immunohistochemistry the caspase-3 showed more intense reaction to IR with 0,9% saline solution treatment. The Bcl-2 was positive without significant difference among averages. Molecular analysis by RT-qPCR for genes expression eNOS and iNOS was observed: the highest expression of iNOS, was significant in IRss and eNOS in PCI and Pentoxifylline treatment. **Conclusions:** The treatments with Pentoxifylline and PCI have been effective in preserving the small bowel cells submitted to ischemia and reperfusion. When associated strategics, there was no synergism.

Key words: Pentoxifylline; Ischemia and Reperfusion; Ischemic Preconditioning; Nitric Oxide; Small Intestine.