



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Pré-tratamento com remifentanil protege contra a redução da contratilidade intestinal relacionada à lesão de isquemia e reperfusão em ratos

Hale Sayan-Ozacmak^a, Veysel Haktan Ozacmak^{a,*}, Inci Turan^a, Figen Barut^b e Volkan Hanci^c

^a Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade Bulent Ecevit, Kozlu, Zonguldak, Turquia

^b Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade Bulent Ecevit, Kozlu, Zonguldak, Turquia

^c Departamento de Anestesiologia e Reanimação, Faculdade de Medicina da Universidade Dokuz Eylul, Inciralti, Izmir, Turquia

Recebido em 18 de julho de 2013; aceito em 2 de setembro de 2013

Disponível na Internet em 1 de outubro de 2015

PALAVRAS-CHAVE

Contratilidade intestinal;
Lesão intestinal de isquemia/reperfusão;
Rato;
Remifentanil

Resumo

Justificativa e objetivos: Alterações funcionais e estruturais sérias do trato gastrointestinal são observadas na insuficiência de irrigação sanguínea, levando a alterações da motilidade gastrointestinal. A ativação dos receptores opioides proporciona um efeito cardioprotetor contra a lesão de isquemia/reperfusão (I/R). O objetivo do presente estudo foi determinar se remifentanil pode ou não reduzir a lesão de I/R do intestino delgado.

Métodos: Ratos machos albinos, da linhagem Wistar, foram submetidos à isquemia mesentérica (30 minutos) seguida de reperfusão (3 horas). Quatro grupos foram designados: *sham* controle; remifentanil isolado; controle I/R; remifentanil + I/R. Os animais do grupo remifentanil + I/R foram submetidos à infusão de remifentanil ($2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) por 60 min, metade dos quais iniciou antes da indução da isquemia. Coletando os tecidos do íleo, a avaliação dos danos foi baseada nas respostas contráteis ao carbacol, nos níveis de peroxidação lipídica e infiltração de neutrófilos e na observação das características histopatológicas no tecido intestinal.

Resultados: Após a reperfusão, uma diminuição significativa da resposta contrátil induzida por carbacol, um notável aumento tanto da peroxidação lipídica quanto da infiltração de neutrófilos e uma lesão significativa da mucosa foram observados. A média da resposta contrátil no grupo remifentanil + I/R foi significativamente diferente daquela do grupo I/R. A peroxidação lipídica e a infiltração de neutrófilos também foram significativamente suprimidas pelo tratamento. As amostras de tecido do grupo I/R apresentaram grau 4 na avaliação histopatológica. No grupo remifentanil + I/R, por outro lado, a lesão da mucosa foi moderada, apresentando estadiamento de grau 1.

* Autor para correspondência.

E-mail: vhaktan@yahoo.com (V.H. Ozacmak).

KEYWORDS

Intestinal contractility;
Intestinal ischemia/reperfusion injury;
Rat;
Remifentanil

Conclusões: O pré-tratamento com remifentanil pode atenuar a lesão intestinal de I/R em um grau notável, possivelmente pela redução da peroxidação lipídica e da infiltração leucocitária. © 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Pretreatment with remifentanil protects against the reduced-intestinal contractility related to the ischemia and reperfusion injury in rat

Abstract

Background and objectives: Serious functional and structural alterations of gastrointestinal tract are observed in failure of blood supply, leading to gastrointestinal dysmotility. Activation of opioid receptors provides cardioprotective effect against ischemia–reperfusion (I/R) injury. The aim of the present study was to determine whether or not remifentanil could reduce I/R injury of small intestine.

Methods: Male Wistar Albino rats were subjected to mesenteric ischemia (30 min) followed by reperfusion (3 h). Four groups were designed: sham control; remifentanil alone; I/R control; and remifentanil + I/R. Animals in remifentanil + I/R group were subjected to infusion of remifentanil ($2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) for 60 min, half of which started before inducing ischemia. Collecting the ileum tissues, evaluation of damage was based on contractile responses to carbachol, levels of lipid peroxidation and neutrophil infiltration, and observation of histopathological features in intestinal tissue.

Results: Following reperfusion, a significant decrease in carbachol-induced contractile response, a remarkable increase in both lipid peroxidation and neutrophil infiltration, and a significant injury in mucosa were observed. An average contractile response of remifentanil + I/R group was significantly different from that of the I/R group. Lipid peroxidation and neutrophil infiltration were also significantly suppressed by the treatment. The tissue samples of the I/R group were grade 4 in histopathological evaluation. In remifentanil + I/R group, on the other hand, the mucosal damage was moderate, staging as grade 1.

Conclusions: The pretreatment with remifentanil can attenuate the intestinal I/R injury at a remarkable degree possibly by lowering lipid peroxidation and leukocyte infiltration.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Os receptores opioides (ROs) ativados protegem contra a lesão de isquemia/reperfusão (I/R) no coração e nos neurônios.^{1–3} Peptídeos opioides e ROs estão presentes no intestino.^{4,5} Remifentanil, um analgésico opioide de ação ultracurta derivado da fenilpiperidina, é um cardioprotetor contra a lesão de I/R através dos ORs mediadores,^{1,6} ativando a proteína quinase C (PKC) e conduzindo os canais de potássio sensíveis a ATP mitocondrial (KATP)⁷ que imitam o pré-condicionamento (PC) isquêmico.^{1,8}

Sepse, hemorragia, transplante intestinal, queimaduras graves e trombose mesentérica causam isquemia mesentérica,^{9,10} resultando em grande impacto no intestino. A I/R intestinal tem um papel importante no desenvolvimento da disfunção primária do enxerto.^{11,12} O tecido intestinal é muito sensível à I/R. Na verdade, embora o trato gastrointestinal represente cerca de 5% do peso corporal, o seu consumo de oxigênio constitui cerca de 20% do total de oxigênio usado.¹³ A interrupção do suprimento de oxigênio diminui a quantidade de ATP intracelular, alterando a homeostase celular através do aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO). A reperfusão induz danos estruturais e funcionais da mucosa e edema intersticial (lesão de reperfusão),¹⁴ que é principalmente devida à geração de ERO a partir de várias fontes, incluindo as cadeias de

transporte de elétrons das mitocôndrias, o metabolismo da xantina-oxidase, as prostaglandinas, as células endoteliais e os neutrófilos ativados.^{14–17} A I/R prejudica a função de barreira da mucosa, provocando a permeabilidade vascular e da mucosa e a translocação bacteriana, terminando por causar a inflamação sistêmica e insuficiência de múltiplos órgãos.¹⁸ A I/R também modifica a resposta contrátil do músculo liso intestinal,^{19–22} que está associada à resposta inflamatória local aumentada pela infiltração de neutrófilos¹⁰ e ERO.²³

Alguns agentes farmacológicos incluindo anestésicos produzem PC.^{24–28} Os ROs, em particular, estão envolvidos no PC do coração de ratos.^{7,8} Além disso, o pós-condicionamento farmacológico induzido por remifentanil também protege contra a lesão cardíaca induzida pela I/R.³ Por outro lado, informação sobre a ocorrência ou não do possível efeito benéfico na lesão intestinal de I/R é extremamente limitada. Apenas um estudo conduzido por Cho et al.²⁹ relata que remifentanil protege o intestino contra a lesão de I/R. Os autores demonstram claramente que remifentanil reduz de forma significativa o stress oxidativo, a resposta inflamatória e a lesão tecidual. Contudo, eles não avaliaram diretamente o efeito sobre as funções fisiológicas do tecido (p. ex., a contratilidade). Portanto, o nosso objetivo foi determinar se remifentanil tem efeito benéfico sobre a contratilidade intestinal alterada pela I/R. Avaliamos a resposta contrátil, as alterações histopatológicas e medimos os níveis teciduais

de malondialdeído (MDA), o marcador de peroxidação lipídica, a atividade da mieloperoxidase (MPO) e o marcador da infiltração de neutrófilos,

Materiais e métodos

Animais

Foram usados no estudo 32 ratos Wistar, machos adultos, pesando 220 ± 20 g (média \pm desvio padrão). Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Bulent Ecevit e mantidos em condições padrão, com livre acesso a ração comercial e água. No dia anterior aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos a jejum durante a noite, mas o acesso livre à água foi permitido. Os animais foram mantidos em gaiolas, em temperatura ambiente constante, usando ciclo de claridade/escurecimento de 12 h. Todos os procedimentos aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição.

Procedimentos cirúrgicos

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg kg^{-1}) por via intraperitoneal, seguido por laparotomia com incisão na linha média na cavidade peritoneal. Após uma suave exteriorização do intestino delgado para a esquerda e deposição sobre gaze úmida, os animais foram submetidos a 30 minutos (min) de isquemia por ligadura da artéria mesentérica superior (AMS) usando fio de seda 3/0. A isquemia intestinal foi confirmada pela falta de pulso na artéria mesentérica e pela cor pálida do jejuno e íleo. Depois disso, os intestinos foram devolvidos ao abdome, que foi fechado com duas pinças pequenas. Após 30 min de isquemia, o abdome foi reaberto e o fio suavemente removido para permitir a reperfusão do fluxo sanguíneo, o que foi confirmado pela observação da pulsação da artéria e de seus ramos no intestino. A temperatura corporal foi mantida a $37,8^\circ\text{C}$ com lâmpada de aquecimento durante o procedimento de I/R.

Grupos experimentais

Os animais foram alocados em quatro grupos de oito cada: (a) no grupo *sham* controle foram submetidos à laparotomia sem a oclusão da AMS; (b) no grupo *sham* remifentanil (remifentanil isolado) foram tratados com remifentanil e uma operação *sham* sem oclusão da AMS; (c) no grupo controle I/R, a oclusão da AMS foi de 30 min, seguida por 3 horas (h) de reperfusão; (d) no grupo remifentanil mais I/R, os ratos submetidos à I/R foram tratados com remifentanil.

O pré-tratamento com remifentanil (Glaxo Group Limited, Lake Forest, IL, EUA) foi feito por infusão ($2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em veia da cauda por 30 min antes da oclusão da AMS e por 30 min adicionais durante todo o período de isquemia. O cateterismo da veia da cauda foi feito com um cateter Polyneo de calibre 24G (Polymed, Poly Med-icare Ltd., Haryana, Índia) para administração da infusão. Os animais dos grupos *sham* controle e I/R receberam solução fisiológica estéril, em volume igual. Após o período de reperfusão, os animais foram sacrificados mediante administração

de doses letais de anestésicos; em seguida, as amostras de íleo foram coletadas e processadas para cada protocolo experimental.

Contratilidade do músculo longitudinal do íleo

A atividade contrátil do músculo longitudinal do íleo foi avaliada em segmentos isolados do íleo após 3 h de reperfusão em solução de banho de órgãos isolados. Amostras (tiras) do músculo longitudinal medindo 5 mm de comprimento foram coletadas a 1 cm da junção ileocecal. Depois de coletar a primeira amostra para a avaliação histológica, outras três amostras do mesmo tamanho foram colhidas para análises de contratilidade e bioquímica. As amostras foram longitudinalmente suspensas sob 2-g de carga em 20 mL de solução de banho tecidual contendo solução de Krebs (em mmol L^{-1} : NaCl, 118,5; KCl, 4,8; KH_2PO_4 , 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2; CaCl_2 , 1,9; NaHCO_3 , 25; glicose, 10,1). A solução recebeu uma mistura de 5% de CO_2 e 95% de O_2 e foi mantida a 37°C . Após 60 min de equilíbrio com carga de 2 g, carbacol foi adicionado ao banho tecidual em várias concentrações finais variando entre 10^{-7} a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. O desenvolvimento de força ativa foi registrado para cada concentração para determinar a relação dose-resposta. A força isométrica foi monitorada pelo transdutor de deslocamento de força externa (FDA-10A, Commat Co, Ancara, Turquia), usando o software MP 30 (MP30 Biopac Systems Inc, Santa Barbara, CA, EUA).

Análise histopatológica da lesão de isquemia-reperfusão em intestino delgado

Os segmentos do íleo foram fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina. As seções de parafina intestinais foram coradas com hematoxilina e eosina para análise morfológica. A análise histopatológica do tecido intestinal reperfundido foi baseada em um método de estadiamento descrito por Hierholzer et al.³⁰ e a avaliação foi pontuada de zero a quatro. Grau 0: nenhuma alteração patológica específica é observada, estrutura normal da parede intestinal, incluindo vilosidades, criptas, lâmina própria e muscular externa; grau 1: lesão leve da mucosa é observada – desnudamento do epitélio das vilosidades, mas em outros aspectos a estrutura está normal; grau 2: danos moderados ocorrem – perda do comprimento das vilosidades e descamação epitelial com evidências de congestão, hemorragia e inflamação da mucosa, mas nenhuma mudança na submucosa ou muscular externa; grau 3: danos extensos são observados – perda de um grande número de vilosidades, incluindo desnudação, descamação e a presença de tecido granulomatoso com o dano localizado na submucosa e muscular; grau 4: danos graves e necrose são observados – inflamação e necrose em toda a espessura da parede intestinal. O pesquisador que fez as mensurações não tinha conhecimento do projeto experimental.

Determinação da atividade de MDA tecidual

Os níveis de peróxidos lipídicos intestinais foram medidos com um método descrito por Casini et al.³¹ Resumidamente,

com um pilão acionado por motor, as amostras de tecido foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) arrefecido em gelo ao adicionar 10 mL de TCA a 10% por grama de tecido. Após a centrifugação, 750 μ L de sobrenadante foram adicionados a igual volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67% e aquecidos a 100 °C por 15 min. A absorbância das amostras foi então medida espectrofotometricamente a 535 nm.

Determinação da atividade de MPO tecidual

A atividade de MPO no sobrenadante do homogenato foi determinada a partir da oxidação da *o*-dianisidina dependente de H₂O₂.³² As alíquotas do sobrenadante (0,1 mL) foram adicionadas a 2,9 mL da mistura de reação contendo 0,167 mg mL⁻¹ de *o*-dianisidina e 20 mM de solução de H₂O₂, que foram preparadas em 50 mM de tampão de fosfato (PB). Imediatamente após a adição da alíquota à mistura, a variação de absorbância a 460 nm foi medida por 5 min. Uma unidade da atividade de MPO foi definida como a degradação de 1 μ mol de peróxido por min a 25 °C. A atividade foi então normalizada como unidade por mg de tecido (U mg⁻¹).

Análise de dados

Os valores para as experiências que avaliam a contratilidade foram normalizadas por grama (g) de tecido. Cada dado mensurado representa a média \pm EP. Para a avaliação estatística, o programa estatístico SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi usado. Testes não paramétricos foram feitos, visto que cada grupo era composto por oito amostras idênticas. Assim, por meio da análise de variância de Kruskal-Wallis (Anova), todos os grupos foram comparados em termos de existência de heterogeneidade. Quando uma heterogeneidade estatisticamente significativa foi detectada em todos os grupos, os grupos individuais foram comparados entre si com o teste de Tukey. Valores-*p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

Contratibilidade do músculo longitudinal do íleo

Em todos os grupos, o carbacol causou um efeito contrátil dose-dependente sobre os segmentos do íleo terminal, proporcionando curvas sigmóides com suas respostas máximas (valores do E_{max}) (fig. 1). O valor do E_{max} de carbacol foi significativamente menor no grupo controle *i/R* do que no grupo *sham* (12,83 \pm 0,76 vs. 22,19 \pm 2,10 g/g de tecido, respectivamente). Em outras palavras, a contração em resposta ao carbacol foi reduzida de forma significativa e dependente da dose pela indução de *i/R*, como indicado pela curva descendente. A diferença estatística entre esses dois grupos foi significativa com todas as doses de carbacol (*p* < 0,01). A redução da contratilidade melhorou de forma significativa com o tratamento com remifentanil. Esse efeito foi estatisticamente significativo para cada dose de carbacol, em comparação com o grupo *i/R*. No entanto, as respostas de contração dos grupos *sham*, remifentanil isolado e remifentanil + *i/R* apresentaram curvas semelhantes com todas as doses de carbacol, sendo estatisticamente indiferentes entre si (*p* > 0,05) (fig. 1). Comparando os valores do E_{max}, o do grupo *i/R* (12,83 \pm 0,76 g/g de

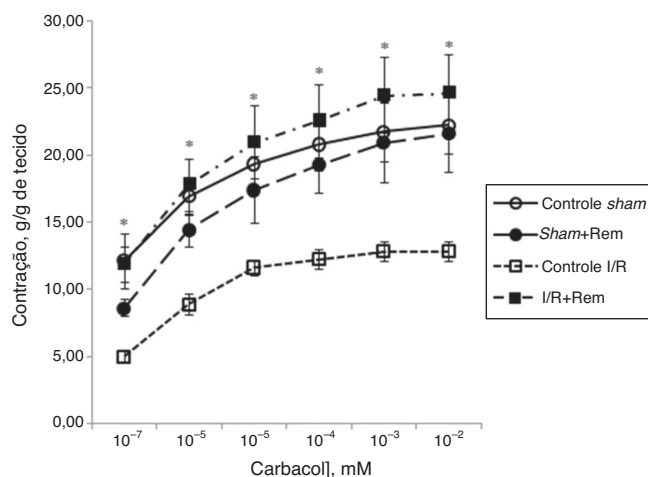


Figura 1 Curvas de concentração-resposta ao carbacol em músculo longitudinal do íleo isolado dos grupos controle *sham*, *sham*+Rem, controle *i/R* e *i/R*+Rem. Cada dado mensurado representa a média \pm EP de oito experimentos. **p* < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa do grupo controle *i/R* (controle *i/R* vs. todos os outros três grupos para cada concentração de carbacol). (Rem: remifentanil; *i/R*: isquemia/reperfusão).

tecido) foi apenas cerca de 58% daquele do grupo *sham* (22,19 \pm 2,10 g/g de tecido). O valor médio do E_{max} do grupo *sham* não foi estatisticamente diferente daqueles dos grupos remifentanil isolado (21,55 \pm 2,85 g/g de tecido) e remifentanil + *i/R* (24,60 \pm 2,86 g/g de tecido).

Resultados histopatológicos

Analisando seis secções por grupo, as alterações mais dramáticas foram observadas no grupo de *i/R* (fig. 2C; tabela 1). Inflamação, desnudação da mucosa e edema foram claramente detectados em algumas partes da mucosa e submucosa, além de áreas necróticas em toda a parede do intestino. Descamação em parte da superfície do epitélio também era evidente. O grupo *i/R* foi, portanto, avaliado como grau 4. No grupo *sham*, como mostra a figura 2A, a estrutura normal da parede do intestino com vilosidades, criptas, lâmina própria e camada muscular foi claramente observada e o grupo foi classificado como grau zero. O grupo remifentanil isolado apresentou aparências muito semelhantes às observadas no grupo *sham*; ou seja, alterações patológicas específicas não foram observadas; portanto, foi classificado como grau zero (fig. 2B). O grupo

Tabela 1 Classificação histológica semiquantitativa das secções do íleo de ratos (6 secções/grupo)

| | Média \pm EP |
|----------------------------|------------------------------|
| Controle <i>sham</i> | 0 |
| <i>Sham</i> + Remifentanil | 0 |
| Controle <i>i/R</i> | 3,83 \pm 0,16 |
| <i>i/R</i> + Remifentanil | 1,17 \pm 0,16 ^a |

Análise de variância simples (Anova), significância estatística entre os dois grupos.

^a *p* = 0,00005.

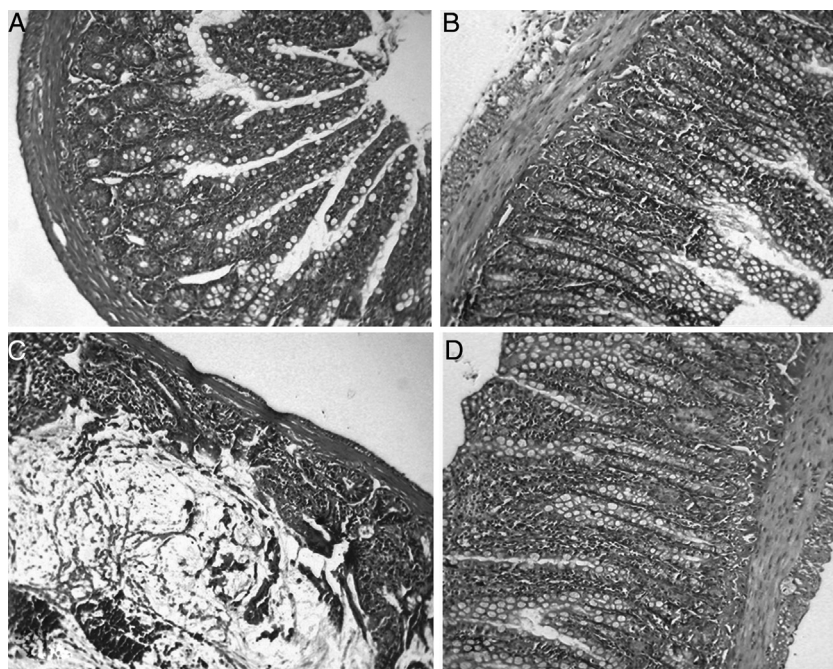


Figura 2 Micrografias ópticas do tecido intestinal de rato: (A) grupo controle *sham* operados; arquitetura normal da parede intestinal sem qualquer alteração patológica (grau 0); (B) grupo *sham* + Rem; aparência histomorfológica normal do tecido intestinal (grau 0); (C) grupo controle *I/R*; alterações morfológicas mais extensas detectadas, como o lúmen intestinal ulcerado, camada muscular significativamente diminuída, perda de epitélio e glândulas e apresentando exsudato superficial e material mucoide (grau 4); (D) grupo *I/R* + Rem; o pré-tratamento melhorou as alterações histopatológicas observadas após a *I/R*; tecido intestinal inflamado com afinamento moderado da mucosa, perda desigual do epitélio, e reação celular inflamatória do tipo mista que é dominada por leucócitos nucleares polimorfos (grau 1). (corante H&E $\times 200$, barras de escala = 50 μm). (Rem: remifentanil; *I/R*: isquemia/reperfusão).

remifentanil + *I/R* apresentou dano moderado da mucosa, apenas com desnudamento focal mínimo do epitélio das vilosidades e foi classificado como grau 1 (fig. 2D).

Níveis de MDA

O teor de MDA nos animais do grupo *sham* apresentou média de $73,29 \pm 7,46 \text{ nmol g}^{-1}$ de tecido, enquanto a média nos animais submetidos somente à *I/R* foi de $156,82 \pm 15,74 \text{ nmol g}^{-1}$ de tecido (fig. 3), um aumento significativo no teor de MDA ($p < 0,001$). O pré-tratamento com remifentanil (grupo remifentanil + *I/R*) reduziu significativamente o teor de MDA intestinal induzido pela *I/R* para os níveis do grupo *sham*. Com um valor médio de $107,80 \pm 8,93 \text{ nmol g}^{-1}$ de tecido, esse grupo foi estatisticamente indistinguível do grupo *sham* ($p = 0,143$), mas estatisticamente diferente do grupo *I/R* ($p = 0,02$). Por outro lado, a média do teor de MDA no grupo remifentanil isolado ($84,03 \pm 14,90 \text{ nmol g}^{-1}$ de tecido) não foi estatisticamente diferente daquela do grupo *sham* ($p = 0,946$).

Atividades de MPO

As médias das atividades das enzimas de MPO dos tecidos dos animais submetidos à operação *sham*, remifentanil isolado, *I/R* e remifentanil + *I/R* foram (em U mg^{-1} de tecido) $0,63 \pm 0,17$, $0,54 \pm 0,08$, $1,60 \pm 0,28$ e $0,83 \pm 0,14$, respectivamente (fig. 4).

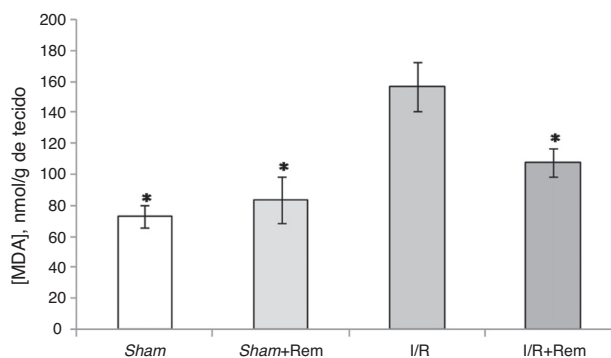


Figura 3 Média do teor de malondialdeído (MDA) em amostras do íleo dos grupos controle *sham*, controle *sham* + Rem, controle *I/R* e *I/R* + Rem. Os dados são expressos em média \pm EP ($n = 8$). Em comparação com o grupo controle *I/R*, uma diferença estatisticamente significativa é indicada como * ($p < 0,05$). (Rem: remifentanil; *I/R*: isquemia/reperfusão).

A *I/R* causou um aumento de aproximadamente 2,5 vezes da atividade de MPO no tecido em relação ao nível basal de atividade ($p = 0,004$). O pré-tratamento com o remifentanil aboliu completamente o aumento da atividade enzimática resultante do insulto de *I/R*; a atividade de MPO nas amostras dos animais pré-tratados com remifentanil foi significativamente diferente daquela do grupo *I/R* ($p = 0,049$). Nenhuma diferença estatística foi observada na atividade de MPO entre os grupos *sham* e remifentanil isolado.

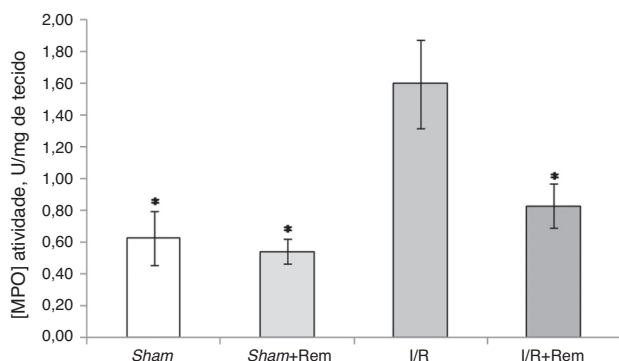


Figura 4 Média de atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras coletadas do íleo dos grupos controle *sham*, controle *sham* + Rem, controle *i/R* e *i/R* + Rem. Os dados são apresentados em média \pm EP para oito animais de cada grupo. Em comparação com o grupo controle *i/R*, uma diferença estatisticamente significativa é indicada como $*$ ($p < 0,05$).

Discussão

O presente estudo demonstra que remifentanil pode ter um potencial de proteção forte contra a lesão intestinal de *i/R*. Evidências indicam que remifentanil atenua a *i/R* induzida: (1) alterações patológicas intestinais; (2) diminuição da resposta contrátil; (3) aumento da infiltração de neutrófilos e (4) elevação da peroxidação lipídica.

Há muitos estudos publicados que apresentam efeitos benéficos do PC farmacológico com remifentanil na lesão de reperfusão em vários tecidos. No entanto, estudos avaliando o PC farmacológico do intestino com remifentanil são muito limitados e carecem de aspectos funcionais, tais como motilidade e secreção. Na verdade, apenas um estudo se dedicou a essa questão. Cho et al.²⁹ mostraram que remifentanil atenua a lesão intestinal de *i/R* em ratos ao reduzir a peroxidação lipídica e a inflamação sistêmica. Nossos dados confirmam os resultados desse estudo em relação à inibição do estresse oxidativo e da inflamação e demonstraram o envolvimento direto dos leucócitos nos tecidos. No entanto, o estudo não investigou diretamente o efeito de remifentanil nas funções fisiológicas do tecido, tais como motilidade e/ou secreção. Portanto, o presente estudo dá um passo adiante ao mostrar que o pré-tratamento com remifentanil melhora a contratilidade reduzida causada pela *i/R*, uma nova descoberta potencialmente relacionada com a atividade anti-inflamatória e antioxidante de remifentanil.

A *i/R* intestinal pode causar falência de múltiplos órgãos, morbidade grave e até morte.^{1,16} A isquemia, tanto aguda quanto crônica, causa um grande impacto funcional e estrutural no intestino, levando à distmotilidade, absorção anormal e alteração da função de barreira contra a translocação bacteriana.^{10,14,33} A *i/R* intestinal aguda causa alterações estruturais de duração tão longa que desenvolve hipertrofia, disfunção celular, morte neuronal, necrose no interior do plexo mientérico^{19,22,33} e infiltração de células inflamatórias (i. é, neutrófilos).^{30,34} Muitos estudos publicados descrevem efeitos deletérios da *i/R* na motilidade intestinal, tais como trânsito gastrointestinal atrasado,³⁵⁻³⁷ complexo motor migratório alterado³⁸ e resposta motora prejudicada a qualquer estímulo.^{20,39,40}

A resposta inflamatória dentro das células musculares e a diminuição da contratilidade do músculo liso circular são acionadas pela *i/R*.^{30,34} A integridade da rede neuronal entérica é necessária para a motilidade gastrointestinal normal. Portanto, a *i/R* pode perturbar a função motora do intestino, alterando as propriedades dos neurônios entéricos ou a transmissão neuroefetora.²² Essas alterações são provavelmente o resultado da resposta inflamatória induzida pela lesão de *i/R*. O dano intestinal que observamos pode estar associado à inflamação, que é especificamente marcada pelo aumento da quantidade de neutrófilos no tecido. A inibição da ativação e da aderência endotelial dos neutrófilos reduz o dano induzido pela *i/R* na mucosa.⁴¹ Em resposta à inflamação do músculo, os neutrófilos são ativados, possivelmente contribuindo para o dano muscular. Portanto, é mais provável que a perturbação da motilidade ocorrida após a *i/R* tenha resultado da grave lesão muscular e da reação inflamatória associada que observamos. O tratamento com remifentanil reduziu não apenas a peroxidação lipídica no tecido, mas também a infiltração de leucócitos, o dano tecidual e o distúrbio na resposta contrátil.

O retorno do sangue oxigenado para o intestino isquêmico agrava ainda mais o dano tecidual principalmente por causa do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando estresse oxidativo.^{17,42} As principais fontes de ERO durante a reperfusão são a xantina oxidase e neutrófilos ativados liberando mediadores pró-inflamatórios e substâncias citotóxicas, como a MPO.¹⁷ A lesão intestinal de reperfusão é considerada como uma doença inflamatória caracterizada pelo recrutamento de leucócitos.⁹ As ERO liberadas na reperfusão estimulam ainda mais a resposta inflamatória, aumentando o recrutamento e a ativação de neutrófilos. A atividade da MPO tecidual, proporcional à quantidade de neutrófilos acumulados, espelha a lesão da mucosa e a taxa de infiltração de neutrófilos em tecido pós-isquêmico.^{17,43} Assim, após a *i/R*, o aumento da atividade da MPO no tecido indicou a melhora da resposta inflamatória no presente estudo. A pontuação histológica elevada das lesões teciduais e a diminuição da resposta contrátil coincidiram com a elevação significativa tanto da atividade da MPO quanto da peroxidação lipídica do tecido no grupo *i/R*. Uma das consequências deletérias do dano oxidativo é a peroxidação lipídica, que eventualmente provoca distúrbios estruturais e funcionais das membranas. O grupo remifentanil + *i/R* apresentou redução significativa tanto da atividade da MPO quanto do teor de MDA, o que indica uma limitação significativa da inflamação. Além disso, a resposta contrátil ao carbacol no mesmo grupo pareceu ser mantida muito próxima à do grupo controle *sham*. Essas descobertas foram corroboradas pela observação histopatológica de que remifentanil resgatou com sucesso a integridade do tecido a partir da lesão de *i/R*.

O PC induzido por opioides protege contra a lesão cardíaca de *i/R*. Em especial, o PC induzido por remifentanil, um analgésico opioide de ação ultracurta derivado da fenilpiperidina, confirma a proteção cardíaca.³ A ativação de κ - e δ -ROs estava envolvida na ativação da PKC, abertura dos canais de KATP mitocondriais e aumento da expressão da proteína antiapoptótica, alvos importantes de proteção cardíaca no PC isquêmico e farmacológico.^{7,8} A sinalização de receptores *toll-like* na via inflamatória também está associada à proteção induzida por opioides no cérebro e

culturas de células. Após a ativação de receptores *toll-like 2*, os agonistas de opioides têm um efeito inibitório na produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos humanos. A inibição é mediada exclusivamente pela microativação dos ROs.² No presente estudo, reconhecemos que a integridade da mucosa intestinal e a resposta contrátil do tecido permaneceram quase normais no grupo remifentanil + I/R. Nossos dados demonstraram que remifentanil diminuiu tanto a peroxidação lipídica quanto o acúmulo de neutrófilos no tecido isquêmico, o que pode ser explicado pelo mecanismo subjacente dos resultados acima mencionados. No entanto, teria sido melhor e confirmativo avaliar os efeitos de um antagonista/agonista da microativação dos ROs no presente modelo, além de examinar um padrão de dose-resposta de remifentanil.

As células do trato gastrointestinal formam um sítio no qual os ROs existem em níveis elevados. A presença de ROs ao longo do trato é demonstrada no nervo e músculo liso.⁴ Muitos estudos relatam que a proteção por remifentanil é mediada pelos ROs.⁴⁴⁻⁴⁶ Por outro lado, alguns sugerem que o mecanismo de mediação independe dos ROs.² No entanto, Zhang et al.⁵ mostram que os peptídeos opioides endógenos podem desempenhar um papel importante no PC isquêmico do intestino delgado. No modelo de inflamação do intestino de rato induzida pelo óleo de cróton, a expressão da microativação dos ROs é relatada como sendo regulada para cima no plexo mientérico do jejuno. Do mesmo modo, os pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII) têm uma expressão aumentada de mRNA dos ROs microativados em seus intestinos delgados e cólons inflamados em relação ao tecido intestinal saudável.⁴⁷ No presente estudo, não sabemos se o efeito protetor de remifentanil foi mediado por mecanismos dependentes ou não de ROs. Contudo, é tentador especular se o efeito benéfico é devido aos processos mediados pelos ROs, já que o tecido tem uma quantidade abundante de ROs e já que as agressões inflamatórias induzem uma regulação para cima dos ROs. Se esse for o caso, então o pré-tratamento com remifentanil possivelmente imita o efeito do PC isquêmico. Isto é, agindo através dos ROs, remifentanil pode eventualmente ativar a PKC através do metabolismo do fosfatidilinositol induzido pela ativação da fosfolipase C ou D ligada à membrana. A PKC em seguida fosforila e estabiliza o estado aberto de ambos os canais de KATP, do sarcolema e da mitocôndria, que eventualmente provoca a citoproteção, como observado na proteção cardíaca induzida por remifentanil.⁷ O pré-tratamento com remifentanil também pode ter um efeito inibidor mediado por ROs sobre a geração de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos em resposta à estimulação de receptores *toll-like 2*.² Nesses casos, a administração de um antagonista de ROs (i. é, naloxona) seria prejudicial para os efeitos preventivos observados no presente estudo. Por outro lado, se os mecanismos não forem mediados por receptores, a proteção intestinal induzida por remifentanil pode ser multifatorial. Nesse caso, como relatado sobre o PC por remifentanil de I/R hepática, a óxido-nítrico sintetase induzível (iNOS) pode mediar os efeitos preventivos em tecido intestinal. Por exemplo, tanto a peroxidação lipídica quanto a inflamação podem ser atenuadas por uma geração elevada de óxido nítrico (NO) endógeno, o que limitaria a quantidade de ERO e atenuaria a resposta inflamatória. Está bem documentado que o NO endógeno pode esgotar as ERO e a lesão

tecidual mediada por neutrófilos, dessa forma reduzindo significativamente a resposta inflamatória. Sabe-se também que a lesão celular induzida por I/R está relacionada com uma diminuição significativa de NO. Portanto, o remifentanil pode estar associado à indução da expressão de iNOS e à consequente geração de NO endógeno no tecido intestinal desafiando a lesão de reperfusão. Se assim for, os efeitos protetores seriam bloqueados por um inibidor de NOS, mas não por naloxona.²

Em conclusão, demonstramos que o tratamento de ratos com remifentanil antes da I/R forneceu proteção contra a lesão da mucosa induzida por I/R e o distúrbio contrátil. Um possível mecanismo responsável por essas atividades salutares de remifentanil, provavelmente, pode ser multifatorial. No entanto, como o presente estudo forneceu evidências, a atenuação da infiltração de neutrófilos e a redução do stress oxidativo parecem ser de primordial importância para obter os efeitos benéficos. Estudos adicionais que priorizem os mecanismos dos efeitos protetores de remifentanil são certamente necessários. Em conclusão, mostramos que a administração de remifentanil durante a isquemia pode ser eficazmente protetora contra a maioria dos aspectos histológicos, citológicos, bioquímicos e fisiológicos da lesão intestinal, fornecendo um potencial terapêutico para a aplicação clínica em isquemia intestinal e distúrbios relacionados com a isquemia. Além disso, o presente estudo sugere que a aplicação de remifentanil como agente analgésico pode ser preferida para aqueles que sofrem de hipoperfusão intestinal e serão submetidos à anestesia.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer àqueles que trabalham na unidade de assistência aos animais por sua inestimável ajuda.

Referências

1. Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives. *Vascul Pharmacol*. 2005;42:211-8.
2. Yang LQ, Tao KM, Liu YT, et al. Remifentanil preconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via inducible nitric oxide synthase expression. *Anesthesiology*. 2011;114:1036-47.
3. Chun KJ, Park YH, Kim JS, et al. Comparison of 5 different remifentanil strategies against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2011;25:926-30.
4. Cosola C, Albrizio M, Guaricci AC, et al. Opioid agonist/antagonist effect of naloxone in modulating rabbit jejunum contractility in vitro. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57: 439-49.
5. Zhang Y, Wu YX, Hao YB, et al. Role of endogenous opioid peptides in protection of ischemic preconditioning in rat small intestine. *Life Sci*. 2001;68:1013-9.
6. Yu CK, Li YH, Wong GT, et al. Remifentanil preconditioning confers delayed cardioprotection in the rat. *Br J Anaesth*. 2007;99:632-8.
7. Zhang Y, Chen ZW, Girwin Met al. Remifentanil mimics cardioprotective effect of ischemic preconditioning via protein

- kinase C activation in open chest of rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26:546–50.
8. Kim HS, Kim SY, Kwak YL, et al. Hyperglycemia attenuates myocardial preconditioning of remifentanyl. *J Surg Res.* 2011;174:231–7.
 9. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396:13–29.
 10. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1359–77.
 11. Suto Y, Oshima K, Arakawa K, et al. The effect of nicorandil on small intestinal ischemia-reperfusion injury in a canine model. *Dig Dis Sci.* 2011;56:2276–82.
 12. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Alarcón-Galván G, et al. The effects of NMDA receptor antagonists over intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;621:78–85.
 13. Orsenigo MN, Porta C, Sironi C, et al. Effects of creatine in a rat intestinal model of ischemia-reperfusion injury. *Eur J Nutr.* 2011;51:375–84.
 14. Flessas II, Papalois AE, Toutouzas K, et al. Effects of lazaroids on intestinal ischemia and reperfusion injury in experimental models. *J Surg Res.* 2011;166:265–74.
 15. Arumugam TV, Arnold N, Proctor LM, et al. Comparative protection against rat intestinal reperfusion injury by a new inhibitor of sPLA2 COX-1 and COX-2 selective inhibitors, and an LTC4 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2003;140:71–80.
 16. Hsieh YH, McCartney K, Moore TA, et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury leads to inflammatory changes in the brain. *Shock.* 2011;36:424–30.
 17. Margaritis EV, Yanni AE, Agrogiannis G, et al. Effects of oral administration of (L)-arginine (L)-NAME and allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci.* 2011;88:1070–6.
 18. Abdeen SM, Mathew TC, Dashti HM, et al. Protective effects of green tea on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Nutrition.* 2011;27:598–603.
 19. Rivera LR, Thacker M, Pontell L, et al. Deleterious effects of intestinal ischemia-reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. *Cell Tissue Res.* 2011;344:111–23.
 20. Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, et al. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats. *Life Sci.* 2002;71:2025–35.
 21. Ługowska-Umer H, Umer A, Sein-Anand J, et al. Endothelin receptor blockers protect against ischemia-reperfusion impairment of gastrointestinal motility in rats. *Pharmacol Res.* 2008;57:413–8.
 22. Shimojima N, Nakaki T, Morikawa Y, et al. Interstitial cells of cajal in dysmotility in intestinal ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2006;135:255–61.
 23. Ozacmak VH, Sayan H, Arslan SO, et al. Protective effect of melatonin on contractile activity and oxidative injury induced by ischemia and reperfusion of rat ileum. *Life Sci.* 2005;76:1575–88.
 24. Yang Q, Dong H, Deng J, et al. Sevoflurane preconditioning induces neuroprotection through reactive oxygen species-mediated up-regulation of antioxidant enzymes in rats. *Anesth Analg.* 2011;112:931–7.
 25. Obal D, Dettwiler S, Favocchia C, et al. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg.* 2005;101:1252–60.
 26. Assad AR, Delou JM, Fonseca LM, et al. The role of KATP channels on propofol preconditioning in a cellular model of renal ischemia-reperfusion. *Anesth Analg.* 2009;109:1486–92.
 27. Xiao YY, Chang YT, Ran K, et al. Delayed preconditioning by sevoflurane elicits changes in the mitochondrial proteome in ischemia-reperfused rat hearts. *Anesth Analg.* 2011;113:224–32.
 28. Huang Z, Zhong X, Irwin MG, et al. Synergy of isoflurane preconditioning and propofol postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in patients. *Clin Sci (Lond).* 2011;121:57–69.
 29. Cho SSC, Rudloff I, Berger PJ, et al. Remifentanyl ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:69–77.
 30. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, et al. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 1999;68:1244–54.
 31. Casini AF, Ferrali M, Pompella A, et al. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene in toxicated mice. *Am J Pathol.* 1986;123:520–31.
 32. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78: 206–9.
 33. Giaroni C, Zanetti E, Giuliani D, et al. Protein kinase c modulates NMDA receptors in the myenteric plexus of the guinea pig ileum during in vitro ischemia and reperfusion. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23:e91–103.
 34. Der T, Bercik P, Donnelly G, et al. Interstitial cells of cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology.* 2000;119:1590–9.
 35. Alican I, Yegen C, Olcay A, et al. Ischemia-reperfusion-induced delay in intestinal transit Role of endothelins. *Digestion.* 1998;59:343–8.
 36. Udassin R, Eimerl D, Schiffman J, et al. Postischemic intestinal motility in rat is inversely correlated to length of ischemia: an in vivo animal model. *Dig Dis Sci.* 1995;40:1035–8.
 37. Hassoun HT, Weisbrodt NW, Mercer DW, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates gut ischemia-reperfusion-induced ileus only after severe insults. *J Surg Res.* 2001;97:150–4.
 38. Hebra A, Hong J, McGowan KL, et al. Bacterial translocation in mesenteric ischemia-reperfusion injury: is dysfunctional motility the link? *J Pediatr Surg.* 1994;29:285–7.
 39. Sayan H, Ozacmak VH, Altaner S, et al. Protective effects of L-arginine on rat terminal ileum subjected to ischemia-reperfusion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46: 29–35.
 40. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci.* 1997;42:878–84.
 41. Schoenberg MH, Poch B, Younes M, et al. Involvement of neutrophils in postschaemic damage to the small intestine. *Gut.* 1991;32:905–12.
 42. Sayan H, Ozacmak VH, Sen F, et al. Pharmacological preconditioning with erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the small intestine of rats. *Life Sci.* 2009;84:364–71.
 43. Tian XF, Yao JH, Zhang XS, et al. Protective effect of carnosol on lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Surg Today.* 2010;40:858–65.
 44. Wong GT, Li R, Jiang LL, et al. Remifentanyl post-conditioning attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury via kappa or delta opioid receptor activation. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2010;54:510–8.
 45. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H1444–51.
 46. Jang Y, Xi J, Wang H, et al. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors. *Anesthesiology.* 2008;108:243–50.
 47. Chakass D, Philippe D, Erdual E, et al. Micro-opioid receptor activation prevents acute hepatic inflammation and cell death. *Gut.* 2007;56:974–81.