

Avaliação do pós-condicionamento isquêmico no tratamento da isquemia mesentérica. Estudo experimental em ratos

Evaluation of ischemic postconditioning effect on mesenteric ischemia treatment. experimental study in rats

Carlos Henrique Marques dos SANTOS¹, José Carlos Dorsa Vieira PONTES², Otoni Moreira GOMES³, Luciana Nakao Odashiro MIIJI⁴, Marco Aurélio Feltrin BISPO⁵

RBCCV 44205-1070

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito do pré e pós-condicionamento isquêmico sobre a lesão tecidual na mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

Métodos: Foram estudados 30 ratos Wistar, distribuídos em três grupos: grupo A, em que se realizou isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos) mesentérica; grupo B, isquemia e reperfusão mesentérica precedidos pelo pré-condicionamento isquêmico por três ciclos de isquemia e reperfusão com duração de dois minutos cada; grupo C, isquemia e reperfusão mesentérica e, precedendo o início da reperfusão, foi realizado o pós-condicionamento isquêmico por três ciclos de reperfusão e isquemia com duração de dois minutos cada. Ao final, ressecou-se um segmento do intestino delgado para análise histológica. Avaliaram-se os resultados pela classificação de Chiu et al. e procedeu-se ao tratamento estatístico.

Resultados: As médias dos graus de lesão tecidual segundo a classificação de Chiu et al. foram: no grupo A, 3,5; grupo B, 1,2; grupo C, 1. A diferença entre o resultado do grupo A com os resultados dos grupos B e C foi considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Conclusão: O pré e pós-condicionamento isquêmico foram capazes de minimizar, com intensidade semelhante, a lesão tecidual na mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

Descritores: Isquemia. Traumatismo por reperfusão. Precondicionamento isquêmico.

Abstract

Objective: To assess the preconditioning and postconditioning effect on intestinal mucosal lesions in rats undergone mesenteric ischemia and reperfusion procedure.

Methods: Thirty Wistar rats were studied and divided into three groups: Group A, 10 rats undergone mesenteric ischemia (30 minutes) and reperfusion (60 minutes); Group B, 10 rats undergone mesenteric ischemia and reperfusion preceded by ischemic preconditioning for three cycles of ischemia and reperfusion for two minutes each; Group C, 10 rats undergone mesenteric ischemia and reperfusion and, preceding the beginning of reperfusion, ischemic postconditioning was performed for three cycles of reperfusion and ischemia for two minutes each. Then, a segment of small intestine was resected for histological analysis. We assessed the results by Chiu et al. score and the statistical analysis was performed.

Results: According to Chiu et al. score, the means of lesion degree were: In the group A, 3.5; Group B, 1.2; Group C, 1. The difference between group A with the groups B and C was considered statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: Ischemic pre- and postconditioning were capable of minimizing - in a similar intensity - the tissue injury on the intestinal mucosa of rats undergone mesenteric ischemia and reperfusion process.

Descriptors: Ischemia. Reperfusion injury. Ischemic preconditioning.

1. Doutor, Professor Assistente.
2. Doutor, Professor Adjunto.
3. Livre Docente, Professor Titular.
4. Mestre, servidora pública.
5. Especialista, servidor público.

Endereço para correspondência:
Carlos Henrique Marques dos Santos
Rua Aluisio de Azevedo, 606 – São Bento – Campo Grande, MS,
Brasil – CEP 79004-050.
E-mail: chenriquems@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

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 [1], demonstrando que a reperfusão é mais lesiva do que a isquemia isoladamente, fato até então desconhecido, 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 et al. [2], 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, Zhao et al. [3] apresentaram o conceito do pós-condicionamento isquêmico (PoCI), 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 PrCI foi tão eficaz quanto o PoCI na prevenção das lesões de reperfusão.

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 [4].

Se confirmada a eficácia do PoCI em seres humanos, 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. Em modelo experimental, já existe evidência de um provável efeito protetor do PoCI sobre a mucosa intestinal de ratos submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica [5].

Assim, considerando as atuais evidências do valor do PoCI em diminuir as lesões teciduais decorrentes do processo de isquemia e reperfusão, torna-se de fundamental importância, e é objetivo deste estudo, avaliar comparativamente a capacidade do PrCI e PoCI de atenuar a lesão tecidual intestinal no processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

MÉTODOS

Este estudo obteve aprovação prévia da Comissão de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Animais estudados

Foram estudados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso variando de 270 a 350 gramas, com média de 305 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Grupos constituídos

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo A - Isquemia e Reperfusão: dez ratos submetidos à isquemia intestinal por 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com pinça vascular, seguida por reperfusão de 60 minutos;

- Grupo B - Pré-condicionamento isquêmico: dez ratos submetidos ao procedimento de isquemia durante 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com pinça vascular e reperfusão por 60 minutos. A fase de isquemia foi precedida por três ciclos de isquemia (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de reperfusão (dois minutos cada);

- Grupo C - Pós-condicionamento isquêmico: dez ratos submetidos ao procedimento de isquemia durante 30 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com pinça vascular e reperfusão por 60 minutos. Entre a isquemia e a reperfusão foram realizados três ciclos de reperfusão (dois minutos cada) intercalados com três ciclos de isquemia (dois minutos cada).

Anestesia

Os animais foram pesados em balança eletrônica de precisão e anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de 2:1 de cloridrato de cetamina (Cetamin[®]), 50 mg/ml, e Cloridrato de Xilazina (Xilazin[®]), 20mg/ml, respectivamente, na dose de (0,1 ml/ 100 g).

Procedimento cirúrgico

Os ratos foram mantidos em ventilação espontânea em ar ambiente durante todo o procedimento. Foram submetidos à laparotomia longitudinal mediana de aproximadamente quatro centímetros, exteriorização do intestino delgado, identificação e dissecação da artéria mesentérica cranial.

No grupo A, a artéria mesentérica cranial foi ocluída por pinça vascular atraumática, que permaneceu durante trinta minutos (fase de isquemia). Após a colocação da pinça, o intestino delgado foi reposicionado na cavidade abdominal e a ferida operatória foi fechada com sutura contínua da pele com fio de náilon monofilamentar 4-0 (mononylon[®]). Terminada a fase de isquemia, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura e a pinça vascular foi retirada, dando início à fase de reperfusão, com duração de 60 minutos. Nos três grupos, iniciada a fase de reperfusão, o abdome foi novamente fechado por

sutura contínua da pele com fio de náilon monofilamentar 4-0 até o término do experimento.

No grupo B, precedendo a fase de isquemia (30 minutos), foi realizado o pré-condicionamento isquêmico por meio de três ciclos de isquemia, com duração de dois minutos cada (oclusão da artéria mesentérica cranial por pinça vascular atraumática), intercalados por três ciclos de reperfusão, também com duração de dois minutos cada (retirada da pinça vascular atraumática da artéria mesentérica cranial). Após a fase de isquemia, realizou-se reperfusão por 60 minutos.

No grupo C, realizou-se a fase de isquemia (30 minutos) e reperfusão (60 minutos). Precedendo a fase de reperfusão foi realizado o pós-condicionamento isquêmico por meio de três ciclos de reperfusão (retirada da pinça vascular atraumática da artéria mesentérica cranial), com duração de dois minutos cada, intercalados com três ciclos de isquemia (oclusão da artéria mesentérica cranial por pinça vascular atraumática), também com duração de dois minutos cada.

Completada a fase de reperfusão, nos três grupos, a parede abdominal foi novamente aberta pela remoção do fio de sutura e foi ressecado um segmento de aproximadamente um centímetro do íleo, cinco centímetros proximal à transição ileocecal, o qual foi aberto em sua borda antimesentérica, lavado com solução salina e colocado em solução de formaldeído a 10% para posterior análise histológica.

Os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico.

Estudo histopatológico

Os segmentos intestinais ressecados, após fixação em solução de formaldeído a 10%, foram submetidos a processamento histológico e as lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e analisadas à microscopia óptica pelo patologista, sem o prévio conhecimento deste sobre o grupo pertencente de cada rato, e foram classificados de acordo com o grau de lesão tecidual segundo Chiu et al. [6]:

- Grau 0: mucosa sem alterações;
- Grau 1: vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou processo inflamatório, porém, com formação do espaço subepitelial de Grunhagen;
- Grau 2: presença de lises celulares, formação do espaço subepitelial de Grunhagen e espaçamento aumentado entre as vilosidades;
- Grau 3: destruição da porção livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e de células inflamatórias;
- Grau 4: destruição estrutural das vilosidades, havendo apenas esboço de algumas, formadas por células inflamatórias e material necrótico, com hemorragia e ulceração glandular basal;
- Grau 5: destruição de toda túnica mucosa, não mais sendo observada qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado sobre a tela submucosa.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico, aplicando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo estabelecido o nível de significância de $P < 0,05$. Foi utilizado o programa Bioestat 2.0.

RESULTADOS

Após a análise histológica do grau de lesão da mucosa intestinal segundo Chiu et al. [6], encontraram-se os resultados sumarizados na Tabela 1 e Figura 1.

No grupo A, a média do grau de lesão tecidual foi 3,5. Metade dos animais deste grupo teve lesão grau 3 e a outra metade, grau 4.

Tabela 1. Resultado da análise histológica dos graus de lesão das mucosas intestinais dos ratos dos grupos A, B e C segundo a classificação de Chiu et al.[6]

Ratos	Graus de Lesão da Mucosa		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
1	3	0	0
2	3	1	1
3	3	1	3
4	3	2	1
5	4	3	2
6	4	3	1
7	4	1	0
8	4	0	0
9	4	0	1
10	3	1	1
Média	3,5	1,2	1,0

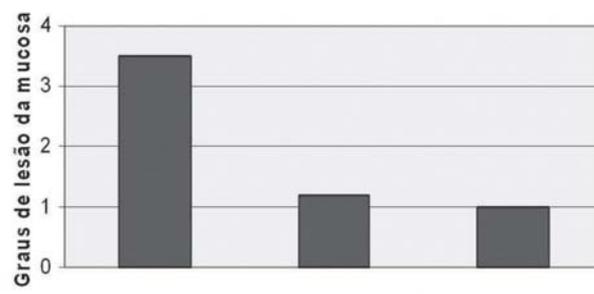


Fig.1 - Gráfico comparativo da análise histológica dos graus de lesão das mucosas intestinais dos ratos dos grupos A, B e C segundo a classificação de Chiu et al. [6]

No grupo B, a média do grau de lesão tecidual foi 1,2. Neste grupo, três animais não apresentaram lesão (grau 0), quatro tiveram lesão grau 1, um, grau 2, e dois, grau 3.

No grupo C, a média do grau de lesão tecidual foi 1. Três animais não apresentaram lesão (grau 0), cinco tiveram lesão grau 1, um, grau 2, e um, grau 3.

Aplicando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, observou-se que os grupos B e C são semelhantes do ponto de vista estatístico ($P=0,7507$), porém, há diferença estatisticamente significativa entre estes e o grupo A (entre A e B $P=0,0004$ e entre A e C $P=0,0002$).

As Figuras 2 a 6 demonstram o aspecto histológico dos graus de lesão tecidual encontrados.

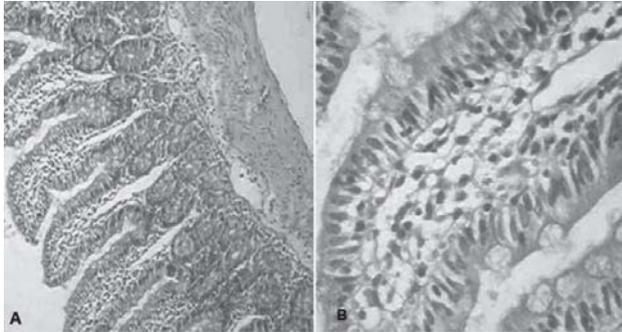


Fig. 2 - Fotomicrografia do grau 0 da classificação de Chiu et al. [6] (HE, A x 100, B x 400) - rato 1 do grupo B

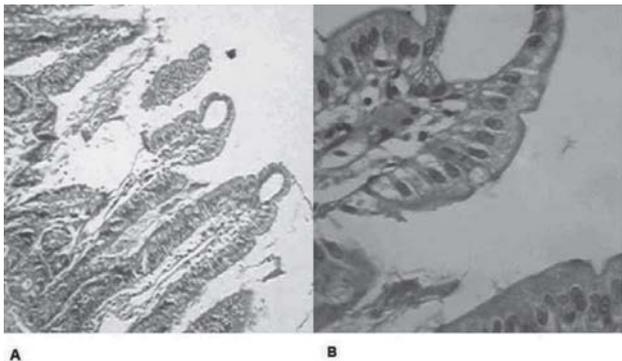


Fig. 3 - Fotomicrografia do grau 1 da classificação de Chiu et al. [6] (HE, A x 100, B x 400) - rato 2 do grupo C

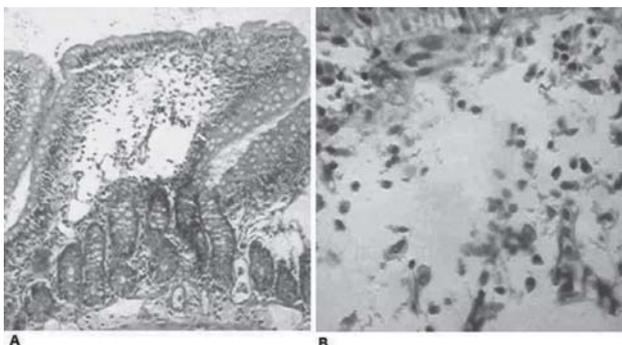


Fig. 4 - Fotomicrografia do grau 2 da classificação de Chiu et al. [6] (HE, A x 100, B x 400) - rato 4 do grupo B

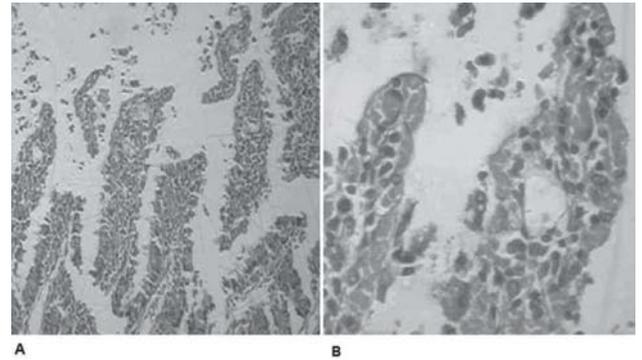


Fig. 5 - Fotomicrografia do grau 3 da classificação de Chiu et al. [6] (HE, A x 100, B x 400) - rato 4 do grupo A

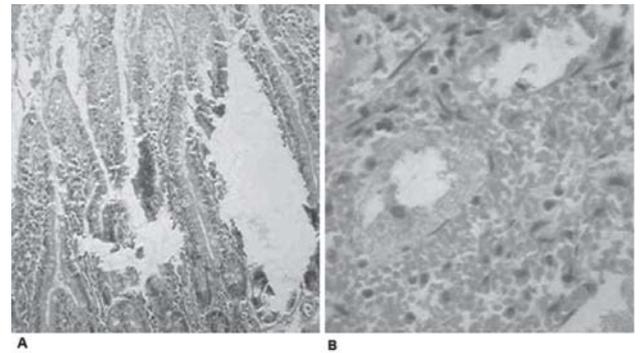


Fig. 6 - Fotomicrografia do grau 4 da classificação de Chiu et al. [6] (HE, A x 100, B x 400) - rato 8 do grupo A

DISCUSSÃO

Dez anos se passaram da publicação de Murry et al. [2] para que os efeitos do PrCI fossem avaliados no intestino. Em 1996, Hotter et al. [7] publicaram um artigo no qual se utilizou de forma eficaz o PrCI na prevenção das lesões por isquemia e reperfusão intestinal em ratos. Os autores compararam um grupo em que se realizou apenas isquemia e reperfusão intestinal com outro utilizando o PrCI, e demonstraram haver menor intensidade das lesões no segundo grupo.

No presente estudo ficou demonstrada a capacidade do PrCI em minimizar os efeitos lesivos do processo de isquemia e reperfusão mesentérica, uma vez que as médias do grau de lesão tecidual foram 3,5 e 1,2 nos grupos controle e PrCI, respectivamente, segundo a classificação de Chiu et al. [6].

Também Sola et al. [8] comprovaram o benefício do emprego do PrCI na isquemia e reperfusão mesentérica, em estudo no qual observaram que no grupo de ratos submetidos exclusivamente a isquemia e reperfusão a média do grau de lesão intestinal segundo Chiu et al. [6] foi 5, e no

grupo em que se realizou o PrCI foi 3. As diferenças entre o grupo isquemia e reperfusão e o grupo PrCI foi estatisticamente significativa tanto neste estudo quanto no de Sola et al. [8], embora os valores sejam bastante diferentes. A justificativa para esta diferença pode estar relacionada ao tempo de isquemia e reperfusão e do PrCI. No trabalho de Sola et al. [8], os animais foram submetidos a 90 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão, em contraste com este trabalho, no qual utilizamos-se 30 e 60 minutos, respectivamente. Também o PrCI foi realizado de forma diferente. Sola et al. [8] realizaram o PrCI com um único ciclo de isquemia e reperfusão com duração de dez minutos cada, enquanto que neste estudo realizou-se três ciclos de isquemia e reperfusão com duração de dois minutos cada.

Moore-Olufemi et al. [9] também utilizaram a classificação de Chiu et al. [6] em seu estudo, onde obtiveram médias 3 e 1,2 nos grupos isquemia e reperfusão e PrCI, respectivamente. Apesar dos resultados bastante semelhantes aos deste trabalho, o método utilizado foi diferente. Moore-Olufemi et al. [9] realizaram a isquemia e reperfusão com duração de 30 minutos e seis horas, respectivamente. O PrCI foi realizado com três ciclos de isquemia e reperfusão com duração de quatro e dez minutos cada, respectivamente.

Outros estudos também demonstraram a capacidade do PrCI em reduzir as lesões intestinais de animais submetidos à isquemia e reperfusão mesentérica [10-16], de forma a tornar evidente que o PrCI é capaz de minimizar os efeitos lesivos do processo de isquemia e reperfusão mesentérica.

O PoCI tem também apresentado resultados semelhantes ao PrCI na prevenção das lesões resultantes do processo de isquemia e reperfusão. Entretanto, no momento existe apenas uma publicação [5] que demonstra ser este método provavelmente semelhante ao PrCI quanto ao seu efeito neste processo na circulação mesentérica.

Zhao et al. [3] foram os primeiros a relatar a semelhança dos resultados do PrCI e do PoCI na prevenção das lesões decorrentes do processo de isquemia e reperfusão. O estudo foi realizado em cães, realizando-se oclusão da artéria descendente anterior esquerda por 60 minutos e reperfusão por três horas. O PrCI foi efetuado por um ciclo de isquemia com duração de cinco minutos e reperfusão de dez minutos. O PoCI consistiu de três ciclos de reperfusão e isquemia com duração de 30 segundos cada. A área de infarto foi semelhante nos grupos PrCI e PoCI e significativamente menor que no grupo controle.

Nos últimos 20 anos, muitas formas de tratamento para a isquemia e reperfusão foram testadas sem grande sucesso [17,18]. Com o advento do PrCI, houve grande avanço no tratamento da Síndrome de Isquemia e Reperfusão, entretanto, especificamente em relação à isquemia e reperfusão mesentérica, seu uso é limitado pelo fato de na maioria dos casos a isquemia já está instalada no momento

do diagnóstico [19]. Este é o principal motivo que valoriza o PoCI, porque, confirmada sua eficácia também na isquemia e reperfusão mesentérica, sua aplicabilidade clínica poderia ser de grande importância. Apesar disso, não há ainda estudos avaliando sua ação na isquemia e reperfusão mesentérica.

No presente estudo observaram-se médias do grau de lesão tecidual 1,2 e 1 nos grupos PrCI e PoCI, respectivamente, segundo a classificação de Chiu et al. [6], em nítido contraste com o grupo controle, no qual o resultado obtido foi 3,5. Isto demonstra que neste trabalho o PrCI e PoCI foram semelhantes na capacidade de prevenir as lesões de isquemia e reperfusão no intestino de ratos.

A maioria dos estudos que analisaram os efeitos do PoCI foi realizada na isquemia e reperfusão miocárdica. Donato et al. [20] compararam o PrCI e o PoCI em corações isolados de coelhos, realizando isquemia e reperfusão de 30 minutos. O PrCI foi realizado por um ciclo de isquemia e reperfusão de cinco minutos cada, e o PoCI, por dois ciclos de reperfusão e isquemia de 30 segundos cada. Concluíram que o PoCI reduz o tamanho do infarto na mesma magnitude que o PrCI, sem modificar a disfunção ventricular pós-isquêmica.

Estes resultados também foram obtidos por Darling et al. [21] em estudo experimental avaliando infarto em corações de coelhos. 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.

Acredita-se que o PoCI possa ter efeito protetor pela ativação dos receptores de adenosina, com base em estudos que demonstraram que se administrando agonistas de tais receptores durante a reperfusão o infarto diminui significativamente [22,23].

Tang et al. [24] demonstraram que o PoCI é 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. Após este período, segundo estes autores, o PrCI apresenta resultados melhores quanto à diminuição da área de infarto.

Além da avaliação do PoCI em corações de animais na isquemia e reperfusão, existe também um relato de seu emprego na medula espinhal. Huang et al. [25] demonstraram que o PoCI foi tão eficaz quanto o PrCI na prevenção de lesões teciduais na medula espinhal de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

O PoCI foi também analisado em seres humanos. Staat et al. [26] relataram seu efeito benéfico realizando reperfusão intermitente durante angioplastia em pacientes com infarto agudo do miocárdio, tendo observado redução da injúria miocárdica. Também Loukogeorgakis et al. [27] realizaram estudo experimental em seres humanos em que provocavam isquemia transitória no membro superior seguida de reperfusão, observando efeito protetor do PoCI.

O mecanismo de proteção do PoCI no processo de isquemia e reperfusão mesentérica ainda não é totalmente claro, mas existem evidências de que o PoCI possa estar relacionado à diminuição significativa nos níveis de malondialdeído e produtos relacionados à peroxidação lipídica. Estas observações sugerem uma redução na produção de EROTO e menor injúria mediada por oxidantes com o PoCI [3].

Uma produção abundante de EROTO durante a fase inicial da reperfusão tem sido implicada como o principal fator na patogênese da injúria tecidual. O pico de produção de EROTO ocorre entre o primeiro e o sétimo minuto após o início da reperfusão, embora sejam detectáveis tais substâncias em períodos mais tardios [21,28,29]. O PoCI age nesta fase de forma ainda não totalmente esclarecida, provavelmente atenuando a produção de EROTO pela liberação paulatina de oxigênio aos tecidos [16,30]. Por este motivo, realizou-se no presente estudo o PoCI logo após a isquemia, realizando-se ciclos curtos de reperfusão e isquemia, uma vez que ainda não há uma definição de qual o melhor tempo a ser utilizado nestes ciclos, nem tampouco o número de ciclos que levaria aos melhores resultados.

Devemos considerar que o presente estudo apresenta limitações quanto à avaliação da lesão tecidual. Utilizou-se a análise histológica, método bastante empregado para esta finalidade, porém, dificultando assim a comparação com outros trabalhos em que se utilizam métodos distintos de avaliação da lesão por isquemia e reperfusão, como, por exemplo, a dosagem de mieloperoxidase e malondialdeído plasmático ou tecidual.

Desta forma, acredita-se que os resultados encontrados neste trabalho demonstram que, de forma semelhante ao que se apresenta na literatura quanto à equivalência da capacidade do PrCI e PoCI de minimizar as lesões por isquemia e reperfusão em coração e medula espinhal, também no intestino de ratos o PoCI minimiza tais lesões na mesma proporção que o PrCI.

CONCLUSÃO

O pré e pós-condicionamento isquêmico foram capazes de diminuir a lesão tecidual na mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica de forma semelhante.

REFERÊNCIAS

1. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986;250(6 Pt 1):G749-53.

2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-36.
3. 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.* 2003;285(2):H579-88.
4. Schipke JD, Halkos ME, Kerendi F, Gams E, Vinten-Johansen J. Postconditioning: a brief review. *Arch Med Sci.* 2006;2:137-45.
5. Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCDV, Miji LNO, Bispo MAF. Post-conditioning: preliminary results of this new option in the treatment of mesenteric ischemia and reperfusion. *Cardiovascular Sciences Forum.* 2007;2(2):13-24.
6. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478-83.
7. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222(1):27-32.
8. Sola A, Hotter G, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. *Transplantation.* 2000;69(5):767-72.
9. Moore-Olufemi SD, Kozar RA, Moore FA, Sato N, Hassoun HT, Cox CS Jr, et al. Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock.* 2005;23(3):258-63.
10. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg.* 2005;92(9):1169-76.
11. Ceylan H, Yüncü M, Gürel A, Armutçu F, Gergerlioglu HS, Bağcı C, et al. Effects of whole-body hypoxic preconditioning on hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury in newborn rats. *Eur J Pediatr Surg.* 2005;15(5):325-32.
12. Wu B, Ootani A, Iwakiri R, Fujise T, Tsunada S, Toda S, et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;286(4):G580-7.
13. Sola A, Alfaro V, Hotter G. Intestinal ischemic preconditioning: less xanthine accumulation relates with less apoptosis. *Apoptosis.* 2004;9(3):353-61.

14. Tamion F, Richard V, Lacoume Y, Thuillez C. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(2):G408-14.
15. Wang SF, Li GW. Early protective effect of ischemic preconditioning on small intestinal graft in rats. *World J Gastroenterol.* 2003;9(8):1866-70.
16. Cinel I, Avlan D, Cinel L, Polat G, Atici S, Mavioglu I, et al. Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats. *Shock.* 2003;19(6):588-92.
17. Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCDV, Miiji LNO, Higa EI. Uso do propofol (2,6 diisopropilfenol) como inibidor da lesão tecidual na isquemia e reperfusão mesentérica. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir Brás.* 2003;18(4):347-54.
18. Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCDV. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. *Rev Bras Coloproctol.* 2006;26(1):28-33.
19. Santos CHM. Evolution and challenges in the pathophysiology of the ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Sciences Forum.* 2006;1(3):6-8.
20. Donato M, D'Annunzio V, Sabán M, Flor L, Gelpi RJ. Poscondicionamiento: un nuevo mecanismo protector. Su comparación con el preconditionamiento en el infarto experimental. *Rev Arg Cardiol.* 2004;72(4):258-62.
21. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):618-26.
22. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP579 infused at reperfusion in rabbit heart. *Heart Dis.* 2003;5(6):368-71.
23. 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.* 2004;116(1):104-15.
24. 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.* 2006;291(5):H2308-17.
25. Huang H, Zhang L, Wang Y, Yao J, Weng H, Wu H, et al. Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemic-reperfusion injury in rabbits. *Can J Anaesth.* 2007;54(1):42-8.
26. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation.* 2005;112(14):2143-8.
27. 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.
28. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitrene. *J Clin Invest.* 1988;82(2):476-85.
29. Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;290(3):H1011-8.
30. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004;62(1):74-85.