

550 - PAPEL DA ADENOSINA E DA VIA PI3K/AKT/MTOR NO EFEITO PROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO NA FORMAÇÃO DE LESÃO POR PRESSÃO EXPERIMENTAL

Tipo: POSTER

Autores: RICARDO DE OLIVEIRA LIMA (HOSPITAL DR. CÉSAR CALS), DIEGO BERNARDE SOUZA DIAS (HOSPITAL GERAL DR CÉSAR CALS), MARIANA LIMA VALE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

Introdução: Lesão por pressão (LP) é definido como “uma lesão localizada da pele e/ou tecido subjacente, normalmente sobre uma proeminência óssea, em resultado da pressão ou de uma combinação entre esta e forças de torção”. No mundo inteiro vem crescendo rapidamente o número de pessoas idosas, que somado ao aumento da obesidade e doenças cardiovasculares resulta em mais pessoas desenvolvendo necessidade de assistência nas atividades da vida diária devido à mobilidade prejudicada, com esse quadro atual vem aumentando também a incidência de lesão por pressão, levando a um tratamento demorado que causa grande ônus financeiro ao sistema de saúde e prejuízo na qualidade de vida dos indivíduos, trazendo incalculável sofrimento ao paciente, angústia ao cuidador e trabalho extra para os prestadores de serviços de saúde, e milhões gastos no orçamento dos serviços de saúde. Encontrar um meio eficaz de prevenção é um dos objetivos mais almejados tanto pelas entidades que estudam a lesão por pressão, como pelos profissionais envolvidos no tratamento clínico deste tipo de lesão. Um procedimento simples e de baixo custo como o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) pode ser uma poderosa ferramenta, protegendo pacientes propensos a desenvolver essa lesão, em todas as camadas socioeconômicas, como também evitando gastos significativos na terapêutica, tanto por parte dos pacientes como dos órgãos governamentais em todo o mundo. O PCIR tem sido muito estudado, como uma forma de prevenção de lesões de isquemia e reperfusão, são muitos os trabalhos que abordam essa temática, e fornecem recomendações para o seu uso em proteção contra infarto do miocárdio, angina, prevenção de lesões de isquemia em transplantes renais e hepáticos. A lesão por pressão por ser também uma lesão de isquemia e reperfusão poderia ser beneficiada com esta forma de prevenção já validada, no entanto, não existe nenhum trabalho que mostre o PCIR para esta finalidade.

Objetivo: Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico remoto na formação da lesão por pressão em modelo experimental de I/R e investigar a participação dos receptores de adenosina nesse processo, através de parâmetros macroscópicos pela escala Experimental Wound Assessment Tool (EWAT) em modelo de lesão por pressão (escores de área da lesão, tipo de tecido, o aspecto e quantidade de exsudato, margem da lesão); análise de escores histopatológicos (parâmetro de fibras musculares, infiltrado neutrofílico, fibroplasia e presença de ulceração, edema, necrose e hemorragia); investigar o efeito do PCIR sobre o estresse oxidativo/nitrosativo e marcadores de lesão/reparo tecidual como p38MAPK e VEGF; investigar a participação da adenosina e de seus receptores mediante ativação da via PI3/Akt/mTOR no efeito preventivo do PCIR na lesão por pressão; e também definir qual o protocolo de PCIR tem efeito mais eficaz na prevenção da lesão por pressão. **Metodologia:** Utilizou-se camundongos Swiss machos, o modelo experimental de LP não invasivo com adaptação foi escolhido por ser menos invasivo e mais simples, não necessitando de procedimentos cirúrgicos ou anestésicos de longa duração, gerando menos sofrimento aos animais. O modelo consistiu na formação de ciclos de isquemia-reperfusão pelo posicionamento de dois imãs na pele do dorso dos animais, os imãs foram posicionados na pele dos camundongos gerando uma pressão de 50 mmHg, permanecendo 12h neste posicionamento, após isto, foram deixados por mais 12h com a pele livre, sem os imãs, formando um ciclo de isquemia/reperfusão (I/R) de 24h. O protocolo de pré-condicionamento isquêmico usado neste trabalho foi realizado mediante anestesia inalatória com isoflurano de 3 a 4% para indução e entre 1 e 2% para manutenção, deu-se início a fase de isquemia do PCIR, através da aplicação de um torniquete elástico na região proximal do membro posterior traseiro esquerdo do camundongo, durante um período de 10 min, após a fase de isquemia, teve sequência a fase de reperfusão do

PCIR, sendo retirado o torniquete elástico permanecendo assim por um período de 30 min. A pesquisa foi dividida em duas fases, na primeira fase foi verificado se o PCIR protegia contra o surgimento de LP ou se atenuava a sua gravidade, além disso também determinado o melhor protocolo de PCIR para proteção de formação de lesão por pressão. Os animais foram divididos em grupo naïve (animais submetidos às mesmas condições dos demais, com exceção do PCIR e da indução da LP); grupo controle (animais submetidos somente a indução da LP); Grupo PI (animais submetidos somente ao PCIR no primeiro dia de indução da LP); Grupo PIV (animais submetidos a quatro PCIR, ou seja, um PCIR em cada um dos quatro dias da indução da LP), ao final, no 6º dia do protocolo foram realizadas fotografia padronizadas das lesões para análises da área da LP por planimetria com o programa ImageJ, no mesmo dia pós-eutanásia, foram retiradas as áreas da lesão com uma pequena margem de pele íntegra com o auxílio de um bisturi e um punch veterinário de 12 mm para biópsia de pele. A lesão excisionada em formato redondo foi seccionada ao meio, e duas metades das duas lesões foram reunidas em microtubos plásticos de 2 ml e congelados a -80°C para posterior realização da quantificação do malondialdeído (MDA), a outra metade das amostras foram fixadas em formaldeído 10% tamponado pH 7,4. Após 24 h, foi trocado o formaldeído 10% por álcool 70% até ser parafinado para a posterior confecção de lâmina coradas com hematoxilina e eosina para análise histopatológica. Na segunda fase foi escolhido o protocolo que mais evidenciou efeitos protetores, o protocolo de PCIR nos quatro dias de indução da LP. Os camundongos foram separados nos seguintes grupos: Grupo naïve (animais não foram submetidos a nenhum procedimento); Grupo Controle (animais não receberam nenhum injetável, também não foi aplicado o PCIR, foi somente induzida a LP); Grupo veículo (animais receberam injeção intraperitoneal do veículo usado para diluir os antagonistas dos demais grupos, realizado PCIR com posterior indução da LP); Grupo A2B* (animais receberam antagonista do receptor de adenosina A2B MRS 1754, foram submetidos ao PCIR e indução da LP); Grupo A2B (animais receberam antagonista do receptor de adenosina A2B MRS 1754 e indução da LP); Grupo A2A* (animais receberam antagonista do receptor de adenosina A2A SCH 58261, submetido ao PCIR e indução da LP); Grupo A2A (animais receberam antagonista do receptor de adenosina A2A SCH 58261 e induzida a LP); Grupo ADA* (animais receberam antagonista da adenosina deaminase (ADA) enzima que degrada a adenosina Cloridrato de EHNA). Foram também submetidos ao PCIR e posterior indução da LP - foram utilizados 6 animais; Grupo ADA (animais receberam antagonista da enzima adenosina deaminase-ADA) Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina-EHNA e também foi induzida a LP); Grupo A1 (animais receberam antagonista do receptor de adenosina A1 8-Ciclopentilteofilina-8-CPT e submetidos ao PCIR e indução da LP); Grupo A1 (animais receberam antagonista do receptor de adenosina A1 8- Ciclopentilteofilina-8-CPT e indução da LP. A avaliação dos dados foi dividida em análise Macroscópica pela EWAT e área da lesão em cm² por planimetria, no 6º dia do protocolo de indução de LP. Análise Microscópica por escores histopatológica; avaliação de imunofluorescência para mTOR, p38MAPK e nitrotirosina; dosagem de citocinas (IL-10); Quantificação da expressão gênica por Polimerase quantitativa em tempo real (RT- qPCR) para PI3Kcg, VEGFa, AKT e mTOR; Avaliação do estresse tecidual por espécies reativas de oxigênio TBARS para detectar MDA presente no tecido. O trabalho teve autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, com processo nº 15/2013. Os protocolos e métodos experimentais usados nesta pesquisa foram norteados pelas recomendações de uso de animais experimentais normatizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL-COBEA) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) Resultados: Foi observado que a adenosina é importante no efeito do PCIR e que provavelmente os receptores A2A e A1 estão envolvidos. Adicionalmente, foi investigado a participação da via PI3K/AKT/mTOR através de qPCR e imunofluorescência para esses marcadores. O PCIR realizado em animais com LP aumentou a expressão de genica de PI3K e marcação de fosfo-mTOR, mostrando que a via está ativada e que o antagonista do receptor A2A inibe essa ativação. Os marcadores como p38MAPK e VEGF também tiveram sua expressão inibidas pelo efeito do PCIR. O efeito sobre o estresse nitrosativo foi visto pela marcação de nitrotirosina, no qual o antagonista de A2A também reverteu o efeito do PCIR. Conclusão: a aplicação do PCIR previne o desenvolvimento da lesão por

pressão em camundongos, evidenciado tanto nos aspectos macroscópicos, histopatológicos e moleculares; o protocolo de PCIR com 1 ciclo de IR por 4 dias consecutivos tem melhores resultados protetores do que o protocolo de 1 dia somente; o efeito protetor do PCIR envolve uma diminuição do estresse oxidativo e nitrosativo, ativando também a p38MAPK; adenosina está envolvida no mecanismo protetor do PCIR, através dos receptores A1 e A2A, sendo A2A mais participativo nesse mecanismo; a via PI3/Akt/mTOR possivelmente está envolvida no efeito preventivo do PCIR mediante ativação pela adenosina.