

JOSÉ LACERDA BRASILEIRO

**ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO EM INTESTINO
DELGADO DE RATOS SUBMETIDOS AO FENÔMENO DE ISQUEMIA
E REPERFUSÃO: AÇÃO DA PENTOXIFILINA E DA
PROSTAGLANDINA E1**

CAMPO GRANDE
2013

JOSÉ LACERDA BRASILEIRO

**ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO EM INTESTINO
DELGADO DE RATOS SUBMETIDOS AO FENÔMENO DE ISQUEMIA
E REPERFUSÃO: AÇÃO DA PENTOXIFILINA E DA
PROSTAGLANDINA E1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração em Tecnologia e Saúde, Cirurgia Vascular e Estudos das Doenças Vasculares na Região Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Celso Massaschi Inouye

Coorientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

CAMPO GRANDE
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOSÉ LACERDA BRASILEIRO

**ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO EM INTESTINO
DELGADO DE RATOS SUBMETIDOS AO FENÔMENO DE ISQUEMIA
E REPERFUSÃO: AÇÃO DA PENTOXIFILINA E DA
PROSTAGLANDINA E1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado: Aprovado

Campo Grande (MS), 16 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Massaschi Inouye (presidente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Profa. Dra. Ana Paula de Assis Sales da Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof. Dr. Carlos Alberto Ferreira de Freitas
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta
Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL)

SUPLENTE

Profa. Dra. Alexandra Maria Almeida Carvalho
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

DEDICATÓRIA

À Mara, minha esposa amada, companheira dedicada, pelo amor, apoio, incentivo e por ter entendido que algumas escolhas na vida ocasionam muitas renúncias e ausências.

Aos meus filhos Fernanda e Davi, por entenderem os momentos de ausência e trazerem tanta alegria a minha vida e por isso serem os grandes incentivadores que me fazem querer evoluir.

Aos meus pais Severino e Maria, pela formação moral e ética e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Alba, Aldo, Francisca, Olivaldo, Fátima, Raquel, Galba e Eliane, pelo incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, acima de tudo, pela maravilhosa experiência da vida e por me permitir ser seu instrumento nos cuidados com o próximo, assim como ser o instrumento da minha paz e por ter me proporcionado uma família graciosa e abençoada que tem sempre estimulado minha carreira universitária.
- A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pois possibilitaram a concretização deste trabalho e a realização do sonho de evoluir na carreira acadêmica.
- Ao Professor Doutor Ricardo Dutra Aydos, Professor Associado da Faculdade de Medicina e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da UFMS, pelo seu mérito em conseguir obter este programa e responsabilidade em manter, contribuindo desta forma para a formação crítica dos profissionais desta instituição.
- Ao Professor Doutor Celso Massaschi Inouye, Professor Titular da Faculdade de Medicina da UFMS, meu orientador, pelos ensinamentos e por ter me incentivado em desenvolver esta pesquisa.
- À Professora Doutora Iandara Schettert Silva, Professora Adjunta da Faculdade de Medicina da UFMS, minha coorientadora, pelo apoio, pelos ensinamentos e orientação de como lidar com os animais que fizeram parte desta pesquisa, auxiliando diretamente no experimento.
- Ao Professor Especialista Gustavo Ribeiro Falcão, Professor auxiliar da Disciplina de Anatomopatologia Especial da Faculdade de Medicina da UFMS, pelo apoio ao trabalho e contribuição para a coloração em hematoxilina e eosina e na preparação das lâminas, assim como leitura e interpretação na análise histológica desta pesquisa.
- Ao Professor Mestre Luiz Carlos Takita, Professor Assistente da Disciplina de Anatomopatologia Especial da Faculdade de Medicina da UFMS e ao Técnico em

Imunopatologia Rodrigo Avelar, pelo apoio incontestável na realização do estudo, leitura e interpretação na análise imunohistoquímica desta pesquisa.

- Ao Professor Doutor Guido Marks, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da UFMS, pela excelente sugestão dos critérios de avaliação para análise imunohistoquímica da pesquisa.

- Ao Professor Daniel Martins Pereira, Professor Assistente da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) e Pós-Graduando do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pelo auxílio, orientação e contribuição na análise estatística deste trabalho.

- Ao Professor Livre-Docente Maldonat Azambuja Santos, Professor aposentado da especialidade de Cirurgia Vascular da Faculdade de Medicina da UFMS, a quem admiro muito, pela ética e moral com que sempre exerceu a profissão médica na especialidade, a quem agradeço pelos conhecimentos técnicos em Cirurgia Vascular e pelo incentivo para o ingresso na vida acadêmica. Um exemplo de dedicação e amor à profissão que tenho tentado seguir.

- Ao Professor Doutor Roberto Teruya, Médico Ecografista e Preceptor da Ecografia Vascular do Programa de Pós-Graduação em Residência Médica a *lato sensu* em Cirurgia Vascular do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da UFMS, pelo incentivo e apoio na realização desta pesquisa.

- Aos colegas e discípulos Cirurgiões Vascular Thiago Dias Miranda, Rilmon Elias da Costa e Leonardo Pereira Alves, pelo apoio e substituição no atendimento dos meus pacientes na minha ausência para dedicação a este trabalho.

- Aos médicos residentes de Cirurgia Vascular Danielle Neves Moura e Cirurgia Geral Ricardo Nakamura, pelo auxílio e colaboração na parte prática deste trabalho.

- À Professora Mestra Telma Bazzano da Silva Carvalho, Bióloga e Chefe do Biotério da UFMS, por permitir que pudesse realizar a etapa prática desta pesquisa.

- Ao Professor Doutor Marco Antônio Gonçalves, médico do Serviço de Urologia do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da UFMS, além de amigo, pelas críticas e sugestões que permitiram aperfeiçoar a redação desta tese.

- Aos funcionários do biotério da UFMS Senhor Francisco Teixeira da Silva e as Senhoras Tamy Ingrid Restel e Maria Donizeti Félix Rocha, pelo zelo e cuidados com os animais utilizados nesta pesquisa.
- Aos técnicos de laboratório do Serviço de Patologia do Hospital Universitário da UFMS Alzira Imiko Ojima, Carlos Teixeira de Oliveira, pela eficiência que prepararam as peças que permitiram o estudo histológico.
- Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Vera Nascimento Silva e Áurea Soares Gobi, pela colaboração e orientação das matrículas, início e término das disciplinas e a necessidade de créditos obrigatórios e optativos para conclusão da Pós-Graduação.
- À Professora Doutora Alexandra Maria Almeida Carvalho, Professora Adjunta da Faculdade de Medicina da UFMS, pela contribuição na correção da formatação desta Tese e apoio incondicional nos momentos em que precisei.
- Aos professores, acadêmicos, médicos residentes e funcionários técnicos administrativos da UFMS, que de algum modo estimularam a realização desta pesquisa.

*Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o
homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é
mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o
ouro. É mais preciosa do que rubis; nada do que você
possa desejar se compara a ela.*

(Provérbios 3: 13 a 15)

RESUMO

Brasileiro, JL. . Estudo histológico e imunohistoquímico em intestino delgado de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia e reperfusão: ação da Pentoxifilina e da prostaglandina E1. Campo Grande; 2013. [Tese - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: Estudar as alterações teciduais do intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão tecidual com uso de pentoxifilina ou prostaglandina E1.

Método: Todos os animais do grupo A (controle), grupo B e grupo C foram submetidos à isquemia intestinal por 60 minutos seguidos por reperfusão por outros 60 minutos. No grupo A, nenhuma droga foi utilizada; no grupo B, foi utilizada pentoxifilina e no grupo C, a prostaglandina E1. No grupo simulado (grupo D-Sham), os animais foram submetidos apenas a procedimentos cirúrgicos sem oclusão da artéria mesentérica. Após a eutanásia dos animais, foi retirado um segmento do intestino delgado e foram realizados procedimentos histológicos, cujas lâminas foram coradas por hematoxilina-eosina e avaliadas pelos critérios de Chiu e, pela imunohistoquímica, usou-se o marcador anti FAS-ligante para marcação de células apoptóticas, estudadas microscópicas após isquemia e reperfusão tecidual. Realizado hipótese estatística de diferença da classificação de Chiu e análise imunohistoquímica para os grupos-controle, PTX, PGE1 e Sham. Os grupos foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados: Os resultados histológicos mostraram que com o uso da pentoxifilina ou da prostaglandina E1 pode-se observar uma melhora na reperfusão tecidual, e os graus que predominaram segundo os critérios de Chiu foram os graus 2 e 3, indicando alterações histológicas menores quando comparadas com o grupo-controle em que não se usou qualquer droga, e que mostraram graus 4 e 5, ou seja, alterações histológicas mais graves. A análise Imunohistoquímica e estatística das médias das células em apoptose, coradas em marrom, nos grupos em que se usou pentoxifilina ou prostaglandina E1, as médias desses grupos foram menores que a média do grupo-controle e maiores do que no grupo simulado ou Sham. Isto demonstrou que o número de células em apoptose diminuiu e que as drogas utilizadas na reperfusão intestinal protegeram a morte celular de muitas outras células epiteliais as quais promoveram, certamente, uma renovação do epitélio intestinal a seguir, apesar dos processos de isquemia e reperfusão tecidual.

Conclusão: O uso das drogas pentoxifilina ou prostaglandina E1 promoveu um efeito benéfico durante a reperfusão tecidual, demonstrado pelas lesões histológicas menos graves e, pela imunohistoquímica, houve diminuição das células apoptóticas e proteção da morte celular de outras células do epitélio intestinal após a reperfusão intestinal, as quais promoveram a renovação desse epitélio, apesar dos processos de isquemia e reperfusão tecidual.

Palavras-chave: isquemia, reperfusão tecidual, intestino delgado, pentoxifilina, prostaglandina E1, imunohistoquímica, anti-FAS ligante, apoptose.

ABSTRACT

Brasileiro, JL. Histological and immunohistochemical study in the small intestine of rats submitted to ischemia-reperfusion injury: action of pentoxifylline and prostaglandin E1. Campo Grande; 2013. [Essay - Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Federal University of Mato Grosso do Sul].

Purpose: to study the small intestinal tissue alterations in rats submitted to ischemia and tissue reperfusion using pentoxifylline or prostaglandin E1.

Methods: the experimental animals of group A (control) were submitted to intestinal ischemia during 60 minutes followed by tissue reperfusion for more 60 minutes and no one drug have been utilized. In the group B pentoxifylline have been utilized during tissue ischemia and reperfusion as well as prostaglandin E1 in group C, but separately. In the group D (sham group), the animals were submitted to surgical procedures without occlusion of mesenteric artery. After euthanasia of the animals, a segment of the small intestine was cut, stained by hematoxylin-eosin and selected to histological analysis according to Chiu criteria, and for immunohistochemical studies the anti FAS-ligand was the marker chosen that stained in brown the apoptotic cells that were observed microscopically. Analysis after ischemia and tissue reperfusion. Performed statistical hypothesis of difference Chiu and immunohistochemical of variance ANOVA with Tukey post-test decision level was set at $p < 0,05$.

Results: it was obtained better histological results using pentoxifylline or prostaglandin E1 since the levels of criteria from Chiu that predominated were level 2 and 3, indicating less tissue damage in comparison to the control group (group A) that showed levels 4 and 5, what means more severe histological tissue alterations. Immunohistochemistry and statistical analysis of the mean apoptotic cells, stained brown apoptotic cells in the groups that received pentoxifylline or prostaglandin E1 were lower than the control group and higher than the sham group. This demonstrated that the number of apoptotic cells decreased and the drugs used in protected reperfusion cell death in many other epithelial cells which promoted certainly a renewal of intestinal epithelial below, although the process of ischemia-reperfusion.

Conclusion: the use of drugs pentoxifylline and prostaglandin E1 in beneficial effect during reperfusion, demonstrated by less severe histological lesions and, by immunohistochemistry, there was a reduction of apoptotic cell death and protection of other intestinal epithelial cells after reperfusion, the which promoted the renewal of the epithelium, although the processes of ischemia and reperfusion.

Keywords: ischemia, tissue reperfusion, small Intestine, pentoxifylline, prostaglandin E1, immunohistochemistry, anti-FAS ligand, apoptosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histológica apresentando a classificação de Chiu para o grau de lesão da mucosa intestinal dos indivíduos submetidos à isquemia e reperfusão de intestino delgado.....	51
Tabela 2 - Análise estatística intergrupo das criptas na avaliação imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão.....	55
Tabela 3 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de a, b, c, d , da esquerda para direita, e analisadas no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas nas criptas analisadas com a média final do Grupo A	55
Tabela 4 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de a, b, c, d , da esquerda para direita, e analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em criptas analisadas com a média final do Grupo B	56
Tabela 5 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido um campo aleatório com quatro criptas denominadas de a, b, c, d , da esquerda para direita, e analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante), calculando as médias em cada subgrupo das criptas analisadas com a média final do Grupo C	57
Tabela 6 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido um campo aleatório com quatro criptas denominadas de a, b, c, d , da esquerda para direita, no campo analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante), calculando as médias em cada subgrupo das criptas analisadas com a média final do Grupo D ou Sham	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografias demonstrando as lesões da mucosa intestinal de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal, segundo a classificação de Chiu et al. (1970). Adaptada: Santos et al. (2010), microscopia óptica 100 x – HE: A – grau zero, ou seja, mucosa sem alterações; B – grau 1, formação de um espaço subepitelial; C – grau 2, há lise celular e espaçamento aumentado entre as vilosidades; D – grau 3, destruição da porção livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e de células inflamatórias; E – grau 4, destruição estrutural das vilosidades e presença de necrose e hemorragia; F – grau 5, destruição total das vilosidades, observando-se apenas material amorfo depositado sobre a tela submucosa.....	21
Figura 2 - Esquema representativo do mecanismo da apoptose celular.	23
Figura 3 - Esquema representativo de apoptose com ativação das caspases pelo anti-Fas ligante.	24
Figura 4 - Esquema representativo da distribuição dos grupos.....	41
Figura 5 - Foto do confinamento dos animais.	42
Figura 6 - Foto do animal anestesiado e após a tricotomia.	43
Figura 7 - Foto das alças intestinais isquemiadas (macroscopia) após a abertura da cavidade e com a presença de clampe vascular traumático.	45
Figura 8 - Fotografias mostrando as etapas do procedimento cirúrgico: A -laparotomia mediana; B - artéria mesentérica cranial isolada; C - oclusão da artéria mesentérica cranial por aplicação de clampe vascular; D - síntese da parede do abdômen.	46
Figura 9 - Foto mostrando o segmento de íleo terminal seccionado a 50 mm da junção ileocecal e desse segmento foram retirados 20 mm de extensão, prontos para ser imerso na solução de fixação de formalina tamponada 10%.....	47
Figura 10 - Fotomicrografias (100x) representativas demonstrando as lesões da mucosa intestinal de ratos submetidos à isquemia e reperfusão zero e 1 de Chiu dos ratos 1 e 4 do grupo Sham, respectivamente.	53
Figura 11 - Fotomicrografias (100x) representativas demonstrando as lesões da mucosa intestinal de ratos submetidos à isquemia e reperfusão 2 e 3 de Chiu dos ratos 7 e 8 dos grupos PTX e PGE1, respectivamente.	53
Figura 12 - Fotografia macroscópica do íleo terminal com isquemia grave antes da reperfusão e fotomicrografias (100x) demonstrando as lesões da mucosa intestinal dos ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal grau 4 e 5 de Chiu dos ratos 5 e 8 do grupo A (controle).	54
Figura 13 - Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica Rato 10A . Imagem capturada pelo microscópio LEICA, modelo DM 500, com dupla cabeça, acoplado com câmera digital LEICA ICC 50 HD, com LAS Software Version 4.0.0, 2011, com conexão ao <i>notebook</i> Dell XPS/M13 GHz, 3582 MB RAM e sistema operacional	

Microsoft Windows Vista® Ultimate. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, no campo analisado no microscópio conforme configuração acima. Em seguida, realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo A**..... 59

Figura 14 -Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 1B**. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita. Realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo B**..... 60

Figura 15 - Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 1C**. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita. Realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo C**..... 61

Figura 16 - Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 1D**. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a b c e d**, da esquerda para direita. Realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo D**..... 62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Classificação de Chiu (grau de lesão da mucosa intestinal) para os grupos- controle, PTX, PGE1 e Sham.	52
Gráfico 2 - Diferença das médias na análise da variância ANOVA com pós teste de Tukey. (1) Controle; (2) PTX; (3) PGE1; (4) Sham.	52
Gráfico 3 - Avaliação comparativa da diferença entre as médias das criptas entre os grupos. Contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante). Distribuição de valores por cripta.	63
Gráfico 4 - Avaliação da Imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante).	63
Gráfico 5 - Avaliação comparativa da diferença entre as médias das criptas entre os grupos. Contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante). Distribuição de valores por cripta.	64
Gráfico 6 - Demonstração em cor da distribuição de valores das médias nas criptas por grupo (média final).	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABC	Complexo Avidina-biotina
Apo-1	Apolipoproteína-1
Apo-1L	Apolipoproteína-1 ligante
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
Bcl2	Linfoma de célula B
Bid	Domínio agonista interagindo - BH3
Bim	Mediador interagindo - Bcl2
cm	Centímetro
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERTO	Espécies reativas tóxicas do oxigênio
FADD	Proteína de domínio de morte associada à FAS
FAS/CD95	Proteína Fas (Superfamília de receptores de TNF, membro 6)
FASL/CD95-L	Ligante da proteína Fas (TNF Superfamília ligante, membro 6)
FAS ligante	Ligante da proteína Fas (TNF Superfamília ligante, membro 6)
GC	Grupo controle
g	grama
I/R	Isquemia e reperfusão
MEHCP	Mono-2-etilhexilftalato
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μm	Micrômetro
μcg	Micrograma
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
MS	Mato Grosso do Sul
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
PTX	Pentoxifilina
PGE1	Prostaglandina E1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 OBJETIVOS	39
3.1 Geral.....	39
3.2 Específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODO	40
4.1 Ambiente	41
4.2 Procedimentos	42
4.2.1 Pré-operatório	42
4.2.2 Anestesia dissociativa	43
4.2.3 Analgesia.....	43
4.2.4 Operação.....	44
4.2.5 Procedimento operatório de reperfusão	44
4.2.6 Processamento histológico.....	47
4.2.7 Processamento imunohistoquímico.....	48
4.2.8 Captura das imagens para análise imunohistoquímica	48
4.2.9 Critérios de avaliação e quantificação da imunohistoquímica	49
4.2.10 Análise estatística da histologia	49
4.2.11 Análise estatística da imunohistoquímica.....	49
4.2.12 Teste de hipóteses	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Resultados da análise histológica	51
5.2 Resultados da análise imunohistoquímica	55
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	69
8 REFERÊNCIAS.....	70
9 APÊNDICE	81
10 ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A interrupção súbita do fluxo sanguíneo arterial provoca isquemia tecidual, a qual desencadeia uma série de alterações metabólicas no território isquêmico, promovendo desde infiltrado inflamatório intenso até a necrose da área afetada. A reparação do tecido só é possível pelo restabelecimento precoce do fluxo arterial. Considerando este evento no intestino delgado pode ocasionar o comprometimento inclusive da manutenção do metabolismo basal da mucosa até necrose de toda estrutura do órgão, dependendo da intensidade e tempo de isquemia (GOMES et al., 2011). A reperfusão, embora necessária para reverter o estado isquêmico, piora as lesões já presentes no período de isquemia, pois com a chegada do oxigênio e a produção de radicais livres, associadas à intensa participação de neutrófilos, amplia a reação inflamatória com consequentes alterações morfológicas como edema intersticial e celular, infiltrado leucocitário, trombose da microcirculação, apoptose ou necrose tecidual. A intensidade dos danos causados pela isquemia dependerá do local da ocorrência de oclusão arterial, da existência de circulação colateral, do grau de demanda de oxigênio dos tecidos envolvidos e do tempo decorrido entre a isquemia e a reperfusão (ARENA et al., 2012; BERTOLETTO et al., 2012).

Dentre as causas arteriais oclusivas da isquemia intestinal aguda, pode-se considerar como as mais frequentes: a embolia arterial aguda de origem cardíaca e de aneurismas da aorta torácica ou abdominal, ateroembolismo ou cristais de colesterol. Trombose aguda da artéria mesentérica superior ou seus ramos, geralmente secundária à aterosclerose prévia, aneurisma da aorta abdominal ou mesentérica superior, vasculites e até causa tumoral (SERPA, TACHIBANA, BARONI, 2010; GOMES et al., 2011). O fenômeno isquêmico intestinal agudo promove altas taxas de mortalidade, acima de 70% da população comprometida, podendo chegar a 100% dos casos dependendo ou não do diagnóstico e tratamento precoce (ARENA et al., 2012; BRAHMBHATT et al., 2013; BULBULOGLU et al., 2011; BYRKA-OWCZAREK et al., 2004; CÁMARA-LEMARROY, 2010). A trombose aguda costumeiramente ocorre nos óstios das principais artérias, e associada a frequente presença de aterosclerose em múltiplas artérias, leva a isquemia de extensas áreas, sendo a sobrevida uma exceção por ser difícil a revascularização (ARENA et al., 2012). Quando se trata de um quadro abrupto, que ocorre

principalmente nos casos de embolia arterial aguda por um período de uma hora, não há tempo para o desenvolvimento de uma rede de circulação colateral que seja suficiente para manter, pelo menos, o metabolismo intestinal mínimo, necessário para evitar a necrose tecidual e quando acontece a revascularização, ou seja, a reperfusão o quadro clínico pode se tornar ainda mais dramático piorando as lesões locais já instaladas e provocando alterações metabólicas sistêmicas extremamente graves, elevando o índice de mortalidade que pode chegar até 100% dos casos, pois fator tempo no diagnóstico e tratamento precoce é determinante para o prognóstico (BERTOLETTO et al., 2008; Santos et al., 2010; BERTOLETTO et al., 2012; SERPA, TACHIBANA, BARONI, 2010; CERQUEIRA et al., 2009).

A respeito das causas não oclusivas, durante o choque de qualquer origem ocorre a vasoconstrição arterial visceral a fim de dirigir o fluxo sanguíneo para as áreas mais críticas como cérebro e coração, o que associado a vasoconstrição venosa pode acrescentar até 30% de volume ao espaço intravascular nesses órgãos. Por algum mecanismo pouco elucidado ou pelo emprego de vasopressores para o controle da hipotensão, tal constrição pode prolongar-se por horas e provocar isquemia intestinal grave (MASSBERG, MESSNER, 1998; CERQUEIRA et al., 2009).

As alterações que ocorrem no epitélio intestinal devido ao processo de isquemia e reperfusão vêm sendo objeto de inúmeros estudos. Dentre essas pesquisas, as alterações histopatológicas ocorridas no epitélio intestinal, após períodos de isquemia e reperfusão vem sendo descritas por diversos autores (VICTONI, 2008; VELTKAMP et al., 2005; SERPA, TACHIBANA, BARONI, 2010; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000; CUZZOCREA et al., 2002; ELLIOT, 1995; FRANCISCO NETO et al., 2005; FREIBERGER et al., 2004). Ressaltam-se, porém, que a maior parte desses estudos objetivou avaliar as alterações e suas consequências com isquemias programadas e reperfusão em curtos períodos de tempo, menor que 30 minutos.

A mucosa intestinal, principalmente do delgado é a primeira e mais gravemente afetada, pois isquemia de uma hora pode produzir edema da submucosa seguido de desprendimento da mucosa, ulcerações e sangramento das vilosidades intestinais. Há perda da barreira entre o conteúdo intestinal e o sangramento, produção de fatores inflamatórios locais que agravam as lesões através da mobilização das células de defesa e fagocitárias, e risco de translocação

bacteriana. Havendo a manutenção da isquemia, há piora do edema, que associado ao processo inflamatório iniciado localmente pioram o ambiente celular local, permitindo a extensão da lesão para as demais camadas da alça (ARENA et al., 2012; BERTOLETTO et al., 2012). A camada muscular geralmente é afetada com duas horas de isquemia perdendo sua função de peristalse normal determinando assim estase do conteúdo, aumento de pressão local o que dificulta ainda mais a já deficiente perfusão tecidual. O último estágio deste processo mórbido compreende a gangrena de toda a parede intestinal, perda de sua estrutura física culminando em perfuração com extravasamento do conteúdo intestinal e consequente peritonite fecal (PARKS, GROGAARD, GRANGER, 1982; GUAN, PRITTS, MONTROSE, 2010).

Santos et al. (2006), em uma revisão da literatura sistemática demonstraram a importância do conhecimento dos processos bioquímicos para melhor entendimento das reações desencadeadas, após um período de isquemia e posterior reperfusão. Esses estudos possibilitaram, mais recentemente, a utilização de fármacos que poderiam atuar, minimizando as consequências danosas desencadeadas no intestino delgado após o fenômeno de isquemia e reperfusão.

A Pentoxifilina (PTX) e Prostaglandina (PGE1) parecem que são substâncias promissoras na proteção tecidual nesse processo, pois apresentam várias propriedades que podem proteger os tecidos das alterações fisiopatológicas provocadas pela reação tecidual da isquemia e reperfusão em vários tecidos inclusive o intestino delgado.

Elas têm ação antioxidante, inibindo diretamente o ânion superóxido, que bloqueia, de forma indireta, a ação da enzima xantinoxidase. Além disso, parece diminuir a resposta inflamatória pela redução da migração dos neutrófilos, assim como de outros mecanismos que ocorrem na inflamação, como a liberação de citocinas, do fator de necrose tumoral, do fator ativador de plaquetas e da endotelina, que é uma potente substância vasoconstritora. A PGE1 além destas propriedades apresenta uma ação vasodilatadora intensa e ainda um papel na ativação da fibrinólise, na modulação da proliferação celular, na fibrinogênese, fibrinólise e angiogênese tecidual (TOPCU et al., 2007; HOSSAIN et al., 2006; GAO, HORIE, 2002; KAWAMURA et al., 2004; MOESER et al., 2006; AWDA et al., 1996; MEHRABI et al., 2001; MORESCHI, 2006; MORESCHI et al., 2007; SPARKES et al., 2010; SHIN et al., 2012; BRASILEIRO et al., 2007; TERUYA et al., 2008; ELLIOT et

al., 1895; TETI et al., 1999; SAVIC et al., 2002; BRASILEIRO, 2006; TERUYA, 2006; MARQUII et al., 2011; CÁMARA-LEMARROY et al., 2010). Estes fármacos apresentarem várias propriedades que parecem oferecer uma melhor proteção tecidual no processo isquemia e reperfusão.

Dessa maneira, no nosso trabalho, abordaremos as possíveis propriedades favoráveis da PTX e PGE1 na atenuação das alterações histológicas conforme os critérios de (CHIU et al., 1970) e imunohistoquímicas utilizando o biomarcador anti-FAS ligante (JING et al., 2010; ASSIS et al., 2013) no processo de isquemia e reperfusão de intestino delgado de ratos, porém sendo programado um tempo de isquemia e reperfusão mais prolongado de 60 minutos.

Considerando-se todos esses suportes teóricos, propôs-se avaliar as propriedades favoráveis na atenuação das lesões teciduais da Pentoxifilina e prostaglandina E1 pelos critérios de Chiu para analisar o grau de lesões histológicas e imunohistoquímicas pelo o biomarcador anti-Fas ligante para identificar a morte celular por apoptose, em intestino delgado de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia e reperfusão tecidual.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Após um determinado período de isquemia, a reintrodução de sangue no segmento afetado do intestino causa a indução e a liberação para a circulação portal e sistêmica de uma série de mediadores químicos, que afetarão o metabolismo da área tanto intestinal como de outros órgãos à distância. Como a mucosa tem a importante função de barreira, suas alterações permitem a passagem de substâncias do conteúdo intestinal para a circulação sanguínea, favorecendo, portanto, a ocorrência da entrada de bactérias na corrente sanguínea. Existem evidências crescentes de que o intestino é berço e alvo de citocinas pró-inflamatórias, e que sua isquemia e reperusão participam de maneira importante e central na resposta inflamatória sistêmica. O desequilíbrio, maior ou menor, entre a oferta e a demanda de sangue para um determinado órgão ou tecido, com consequente hipóxia tecidual, desenvolve alterações patológicas diversas de acordo com a intensidade e duração do período de isquemia (BERTOLETTO et al., 2008; BERTOLETTO et al., 2012; SANTOS et al., 2008; CERQUEIRA et al., 2009; SERPA, TACHIBANA, BARONI, 2010).

Sabe-se que na isquemia pode promover necrose tecidual, porém com a reperusão no restabelecimento do fluxo sanguíneo, e mesmo com a restituição da oxigenação e do aporte de nutrientes aos tecidos, ocorre liberação de radicais livres, que paradoxalmente aumentam as lesões teciduais locais já existentes e a distância. Desse modo, associadas diretamente à restrição da circulação sanguínea, as lesões histopatológicas, detectadas pela microscopia ótica e/ou pelo uso de técnicas imunohistoquímicas, podem ser utilizadas como indicadoras das alterações dos tecidos submetidos à isquemia e reperusão tecidual (BERTOLETTO et al., 2012; BRASILEIRO et al., 2007; SILVEIRA et al., 2004; LENG et al., 2011). A isquemia celular compromete a integridade da membrana celular pela oferta inadequada de oxigênio para seu metabolismo e produção de energia, e também pelo acúmulo direto ou indireto de metabólitos e de mediadores químicos da inflamação local, que causaria disfunção celular (SILVEIRA, YOSHIDA, 2004; FRANCISCO NETO et al., 2005).

CrITÉRIOS histolÓgicos de avaliaÇão de Chiu et al. (1970) para graduar as lesões histolÓgicas encontradas em intestino delgado após o fenômeno de isquemia e reperfusão conforme classificaÇão abaixo:

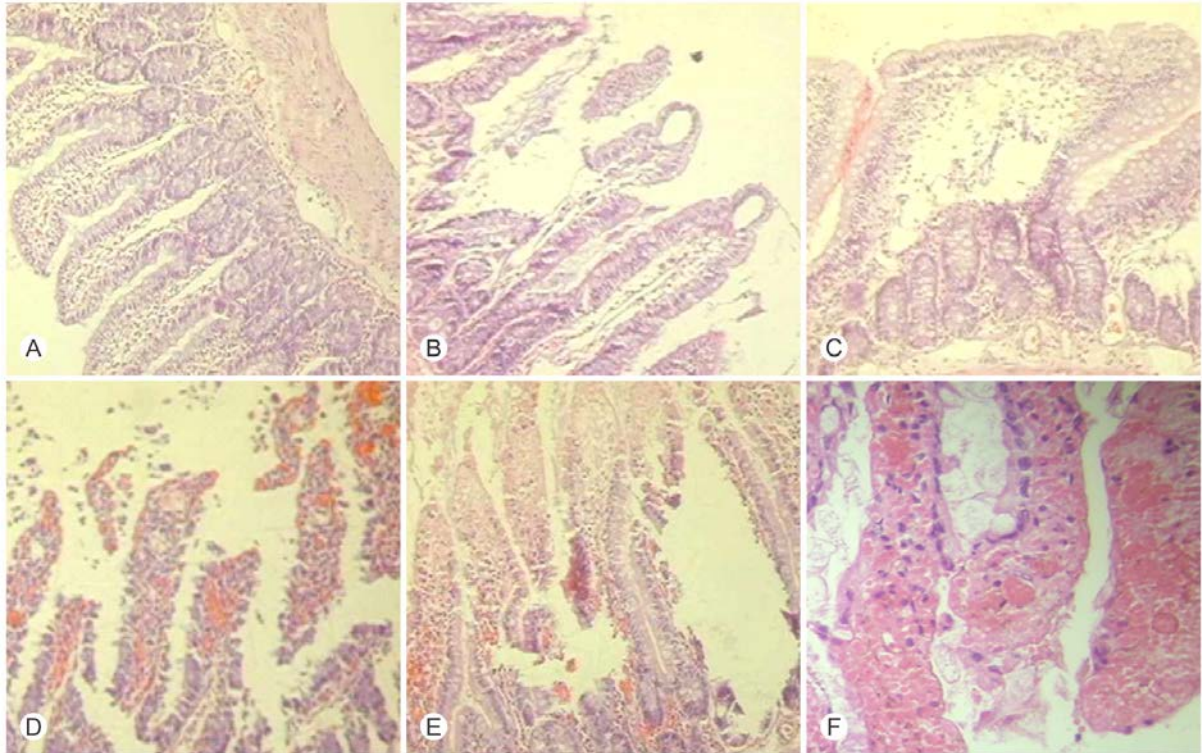


Figura 1 - Fotomicrografias demonstrando as lesões da mucosa intestinal de ratos submetidos  isquemia e reperfusão intestinal, segundo a classificaÇão de Chiu et al. (1970). Adaptada: Santos et al. (2010), microscopia óptica 100 x – HE: A – grau zero, ou seja, mucosa sem alteraÇões; B – grau 1, formaÇão de um espaÇo subepitelial; C – grau 2, há lise celular e espaÇamento aumentado entre as vilosidades; D – grau 3, destruiÇão da porÇão livre das vilosidades, presenÇa de capilares dilatados e de células inflamatórias; E – grau 4, destruiÇão estrutural das vilosidades e presenÇa de necrose e hemorragia; F – grau 5, destruiÇão total das vilosidades, observando-se apenas material amorfo depositado sobre a tela submucosa.

- Grau 0: mucosa sem alteraÇões.
- Grau 1: vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou processo inflamatório, porém, com formaÇão do espaÇo subepitelial de Grunhagen.
- Grau 2: presenÇa de lise celular, formaÇão do espaÇo subepitelial de Grunhagen e espaÇamento aumentado entre as vilosidades.
- Grau 3: destruiÇão da porÇão livre das vilosidades, presenÇa de capilares dilatados e de células inflamatórias.

- Grau 4: destruição estrutural das vilosidades, havendo apenas esboço de algumas delas, presença de células inflamatórias e material necrótico, áreas hemorrágicas e com perda de todo o epitélio das vilosidades e criptas.
- Grau 5: destruição de toda a mucosa, não se observando mais qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado na região da submucosa.

A morte celular, definida como perda irreversível da estrutura e das funções vitais da célula, ocorre por dois processos morfológicamente distintos: necrose e apoptose. Sabe-se atualmente que os dois fenômenos contribuem para a morte celular nas doenças hepatobiliares e intestinais e que a opção da célula por uma dessas formas de morte é influenciada pelo seu estado energético (reserva de trifosfato de adenosina - ATP). Como processo ativo, a apoptose requer reservas de ATP (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala quando há depleção total do ATP (HARADA et al.,1997).

A necrose caracteriza-se pela perda da integridade da membrana plasmática quanto a sua permeabilidade. Diferentes insultos patológicos, como isquemia, hipoxia, hipertermia, irradiação e metabólitos tóxicos, podem levar à perda abrupta da integridade da membrana plasmática (citólise) e à alteração de seus gradientes eletroquímicos. Ademais, a liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular estimula a resposta inflamatória e amplia a lesão tecidual. O fenômeno de morte celular por necrose é facilmente reconhecido nos espécimes de biopsia hepática e intestinal porque os restos celulares permanecem por longo período antes de serem removidos pelas células inflamatórias (KAPLOWITZ, 2000).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é por meio dos receptores da morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria identificada dos receptores da morte é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (FNT) e é caracterizada por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada cadeia da morte (*death domain*), essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e mais bem caracterizados é o receptor Fas (CD95 ou APO-1), abundantemente expresso no fígado e cuja importância na fisiopatologia hepática e

na homeostasia tem sido amplamente documentada em diversas observações (PAROLIN, REASON, 2001).

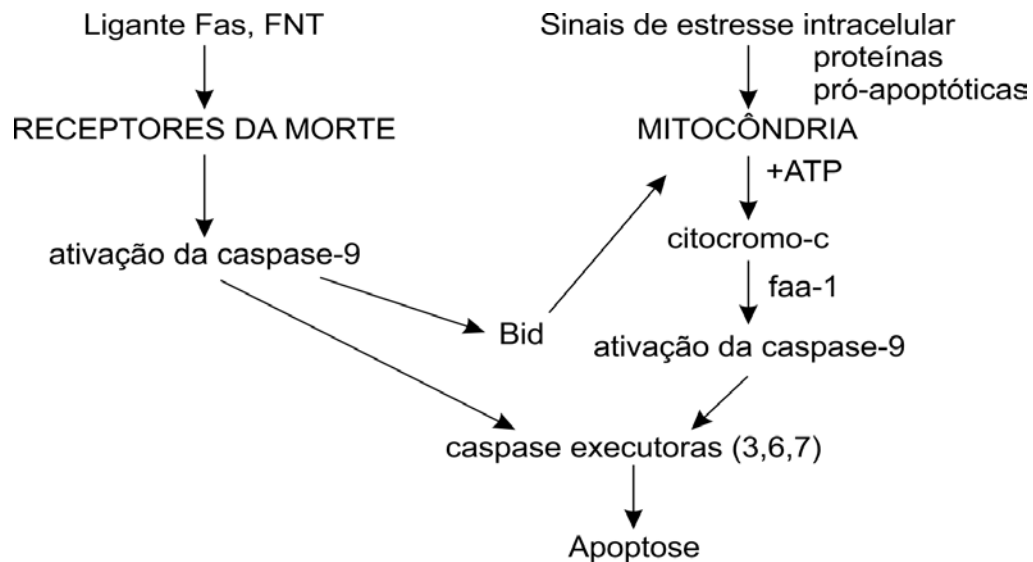


Figura 2 - Esquema representativo do mecanismo da apoptose celular.

O receptor-Fas é expresso em uma variedade de células, incluindo células epiteliais, hematopoiéticas e linfócitos B e T ativados. O padrão de expressão tecidual do ligante Fas é mais restrito, sendo expresso nos linfócitos T maduros CD4+ e CD8+ e nas células *natural killer* ativadas. Quando o ligante-Fas se acopla ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando agregado de cadeias da morte. Este permite que elas se liguem a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia da morte associada ao Fas ("Fas-associated death domain" - FADD). A ligação desse complexo à pro-caspase-8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora) (Figura 1). A expressão simultânea de receptor-Fas e ligante-Fas em linfócitos maduros ativados pode representar mecanismo de autolimitação da resposta imunológica (KAPLOWITZ, 2000).

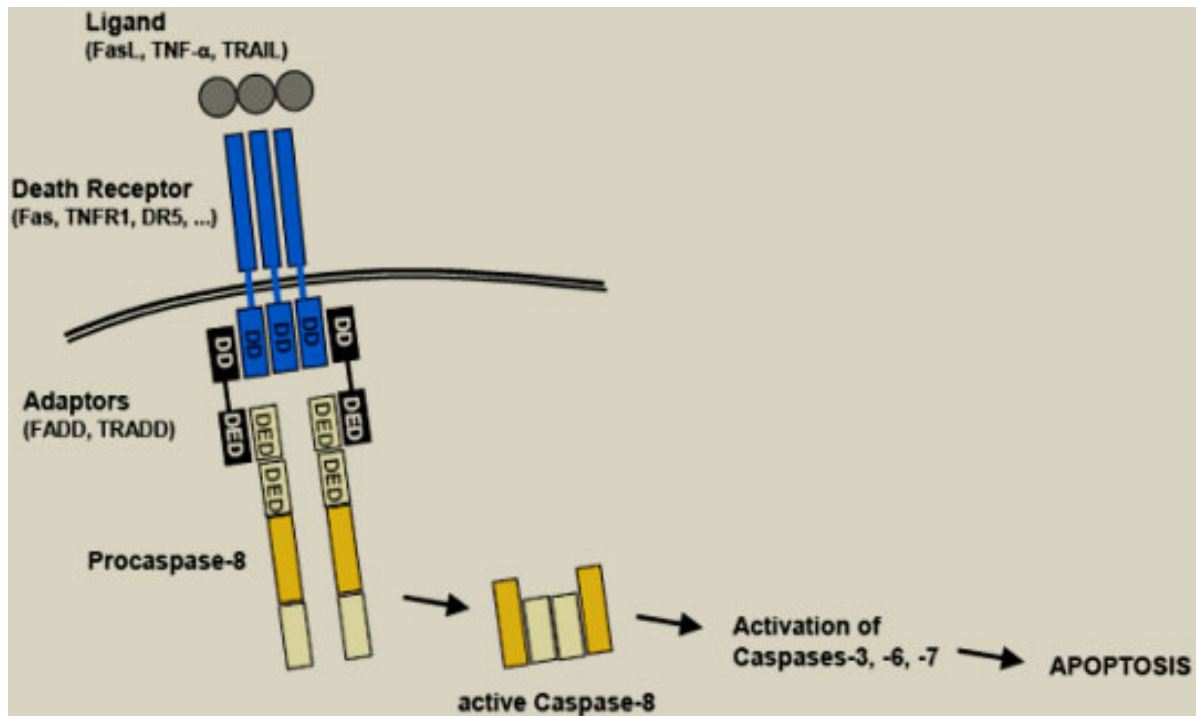


Figura 3 - Esquema representativo de apoptose com ativação das caspases pelo anti-Fas ligante. Fonte: DENAULT, SALVESEN (2002).

Têm-se buscado formas de abolir ou minimizar os efeitos destas espécies reativas de oxigênio ou radicais livres. Para isto têm-se utilizado substâncias inibidoras da formação dos radicais livres conhecidas como antioxidantes (vitamina E, o ácido ascórbico, a deferoxamina, a estreptoquinase, o alopurinol, os sais de magnésio, os aminoesteróides, os quelantes do ferro e os antiinflamatórios não esteróides, substâncias varredoras destas substâncias (scavengers), processos de pré e pós-condicionamento isquêmico, onde supressões parciais e progressivas de oxigenação antecedem uma supressão sustentada mais prolongada (BERTOLETTO et al., 2008; BERTOLETTO, 2012; DA SILVA, 2004; PICCINATO et al., 2004; ALVES et al., 2003; BOZKURT et al., 2002; SANTOS et al 2006; SANTOS et al., 2009; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2001; SHARIKABAD et al., 2001; UHLE et al., 2000; MÜHLBACHER, LANGE, MITTERMAYER, 2009).

Cada uma destas proposições têm mostrado vantagens e desvantagens na dependência dos modelos para a provocação de isquemia e reperfusão, nas doses das substâncias utilizadas, nos períodos em que são empregadas, nos parâmetros que são usados para avaliação dos resultados. Considerando que esses fármacos utilizados na maioria das vezes oferecem apenas a função de antioxidantes ou varredores dos radicais livres, isso torna insuficiente na proteção das alterações do

fenômeno isquemia e reperfusão, pois seus mecanismos fisiopatológicos são extremamente complexos o que fazem na maioria das vezes obterem resultados de proteção insuficientes ou controversos na literatura. Necessitando, portanto de um fármaco que ofereça proteção não somente como antioxidante, mas que tenham várias funções de proteção evitando todos os mecanismos fisiopatológicos envolvido no processo isquemia e reperfusão e assim tentar controlar as alterações teciduais graves provocadas por este fenômeno.

Takamori et al. (1989); Langer, Sohal, Blennerhassett (1995); Langer, Sohal, Riddell (1993); Pan (2011); Cruzzocrea et al. (2002); Francisco Neto et al. (2005); Elliot (1995); relataram os mecanismos fisiopatológicos descrevendo todos os passos de atuação dos mediadores e várias substâncias envolvidas no processo das lesões provocadas pela isquemia reperfusão em muitos tecidos, inclusive o intestino delgado.

A maior parte dos radicais livres produzidos após a reperfusão dos tecidos é mediada pela enzima xantina oxidase (XO). Esta enzima está presente em vários tecidos, mas se encontra em maiores concentração no intestino, células endoteliais, pulmão, musculatura esquelética, fígado e rim. Esta enzima é sintetizada a partir da xantina desidrogenase (XDH). A conversão da XDH para XO está associada a redução do fluxo sanguíneo para os tecidos, limitando desta forma o aporte de ATP. Com a redução do ATP intracelular disponível, a célula é incapaz de manter o gradiente de ions entre os compartimentos intra e extracelular proporcionando assim um aumento do cálcio citoplasmático, que por sua vez promove a ativação de proteases que atuam na conversão de XDH par XO. Durante o período de redução do fluxo sanguíneo para o tecido, ocorre o consumo progressivo do ATP, com subsequente aumento da adenosina monofosfato (AMP) que e posteriormente catabolizada em adenosina, inosina e hipoxantina, sendo esta última um substrato fundamental para a xantina oxidase na produção de radicais livres. Quando o fluxo sanguíneo para o tecido é restabelecido, o oxigênio reage com a hipoxantina e XO produzindo ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em condições fisiológicas, os efeitos deletérios de $O_2^{\cdot -}$ são minimizados pela enzima superóxido desmutase (SOD), presente na mitocôndria e no citoplasma, e que converte $O_2^{\cdot -}$ em água oxigenada (H_2O_2). Numa reação subsequente, a catalase reduz o peróxido de hidrogênio em água, evitando a formação do radical hidroxila que é extremamente agressivo aos tecidos. Outros mecanismos intracelulares de defesa são a glutathiona

e a presença desta substância promove a remoção do íon ferro, bloqueando a formação de radical hidroxila a partir do $O_2^- H_2O_2$ (reação de Fenton). O superóxido (O_2^-) é, na verdade, um radical de baixa energia, porém é responsável pela produção da hidroxila (OH) que, através de uma reação química denominada peroxidação lipídica, promove a desestruturação dos ácidos graxos presentes, promovendo alterações estruturais na membrana citoplasmática e nas organelas do interior das células.

O infiltrado de neutrófilos ocasionado pelo o acúmulo de leucócitos, principalmente nas vênulas pós-capilares, são os principais responsáveis pela lesão de isquemia-reperfusão. A migração dos leucócitos para as áreas de inflamação é bastante complexa e se divide basicamente em três etapas denominadas de rolamento, adesão e extravasamento. Na primeira fase, ocorre interação de moléculas de adesão localizadas no endotélio (P-selectina e E-selectina) e a L-selectina presente nos leucócitos. Numa fase subsequente, ocorre a ativação nos leucócitos de B^2 -integrinas (CD^{11a} , CD^{11b} , e CD^{11c} CD^{18}). Após a ativação destas integrinas, ocorre a ligação destas com moléculas de adesão denominadas ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) e VCAM-1 (*vascular cellular adhesion molecule*), expressas na superfície endotelial. A interação entre as moléculas permite uma firme ligação entre o leucócito e a parede endotelial, possibilitando desta forma a posterior migração destas células para o espaço intersticial. Os neutrófilos promovem a lesão tecidual por diversos mecanismos, incluindo a liberação de enzimas proteolíticas como as elastases, produção de radicais livres de oxigênio, ou ainda pela obstrução mecânica do fluxo microcirculatório, estendendo ainda mais a área de isquemia após a reperfusão.

Um outro mecanismo é pela a ativação do sistema complemento, com um aumento significativo dos níveis séricos principalmente de C3a e C5a, tem sido demonstrada em humanos com isquemia de membros inferiores. O envolvimento do sistema complemento na lesão de isquemia-reperfusão. Também tem sido demonstrado em diversos modelos experimentais. Utilizaram camundongos deficientes em C5 foi demonstrada uma redução significativa de permeabilidade pulmonar, dos níveis de mieloperoxidase nos pulmões, fígado e intestino dos valores de alanina aminotransferase (ALT), além da redução das lesões histológicas locais, quando comparada com os camundongos normais submetidos a isquemia-reperfusão dos membros inferiores, pulmões e intestino. Segundo estes autores

demonstraram a redução das alterações locais e sistêmicas após o fenômeno de isquemia-reperfusão em alguns tecidos, inclusive intestino delgado com o uso de antagonistas do C5aR. A ativação do sistema complemento está relacionado com a ativação de uma potente sequência de eventos inflamatórios, incluindo expressão de moléculas como ICAM-1 e de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1.

Oxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina através de uma família de enzimas conhecidas como NO sintase (NOS). Três enzimas NOS foram identificadas recentemente. NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida ou induzível (iNOS). Enquanto a eNOS e a nNOS são expressas nas células normalmente, a iNOS é expressa apenas após estímulo destas células por mediadores inflamatórios como as citocinas e fatores de crescimento de colônias. As duas formas ditas constitutivas da NOS (eNOS e nNOS) são de importância fundamental na manutenção de viabilidade celular, e a inibição destas enzimas promove grave lesão celular. Já a indução da iNOS produz uma grande quantidade de NO e peroxinitrito, levando a lesão celular. Quanto maior for a quantidade de NO e peroxinitrito, aumenta a lesão celular. Portanto, a inibição desta enzima (iNOS) pode ser considerada como uma importante arma terapêutica na lesão de isquemia-reperfusão em diversos órgãos, incluindo o intestino delgado.

Proteínas pró-inflamatórias também são responsáveis pelo mecanismo preciso de ligação entre a formação de radicais livres de oxigênio e a secreção de mediadores inflamatórios, porém ainda é controverso segundo estes autores acima mencionados. Aparentemente, o NO apresenta um fator de extrema importância na síntese das proteínas inflamatórias. O oxido nítrico regula de maneira direta NF- κ B, criando a expressão de genes envolvidos no fenômeno de IR²O NF- κ B geralmente está presente no citoplasma de células normais não estimuladas em um complexo binário p65 p105 ou terciário p50 p65 I- κ B. O estímulo destas células com certas citocinas, oxidantes ou mediadores inflamatórios como PAF e LTB₄ resulta na fosforilação da subunidade para o núcleo da célula, culminado com a ativação da transcrição de certos genes. NF- κ B induz a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), interleucinas, iNOS, COX-2, entre outros. Neste ínterim, o NO parece ter um papel modulador na ativação do NF- κ B, prevenindo a formação de substâncias que ativam o NF- κ B.

Heme oxigenase (HO) HO-1 é a enzima que controla a conversão do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina e o íon ferro (Fe^{2+}). Existem três formas de heme oxigenase (HO-1, HO-2 e HO-3), aparentemente, apenas a HO-1 tem papel fundamental na homeostase durante o fenômeno de isquemia e reperfusão celular. O sistema HO-1 apresenta quatro funções benéficas: Função antioxidante, manutenção da microcirculação, função anti-inflamatória e antiapoptose.

A função antioxidante está relacionada com a degradação do heme, produção de bilirrubina e formação de ferritina via Fe^{2+} . Com a produção do CO, com suas propriedades vasodilatadoras e antiplaquetárias, ocorre a manutenção do fluxo sanguíneo na microcirculação. Além disso, o monóxido de carbono parece também estar associado à modulação da morte celular programada.

Na apoptose também a HO-1 apresenta funções anti-inflamatórias, através do controle da expressão e produção de moléculas de adesão entoteliais e fatores quimioatraentes. Outros autores demonstraram que a HO-1 e a biliverdina modulam o recrutamento de leucócitos pelos órgãos, incluindo intestino, fígado, pulmão e rim.

A xantina desidrogenase (XD), é uma das enzimas responsáveis pelo mecanismo de fornecimento de um elétron altamente energético para a nicotinamida adenina difosfato (ADP) que sendo receptora deste elétron se transforma no ATP, armazenando a energia de modo estável e transportável dentro da própria célula ou para outros tecidos e órgãos. A supressão do oxigênio determina a conversão da XD em xantina oxigenase (XO). Esta enzima utiliza o oxigênio como receptor de elétrons, numa ligação instável e altamente energética formando os conhecidos radicais livres de oxigênio (RLO) ou espécies reativas de oxigênio (EROs) como o superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os radicais livres de oxigênio determinam a destruição das camadas lipoprotéicas das membranas celulares, do núcleo, mitocôndrias e do citossol levando a morte celular imediata por necrose ou desencadeando processos bioquímicos que, após um determinado tempo, levará à morte celular por apoptose pela via extrínseca ou intrínseca.

Wu et al. (2002); Bertoletto et al. (2012); Bertoletto et al. (2008) demonstraram o papel da iNOS sobre o processo de apoptose na mucosa intestinal de rato após I/R, assim como seu efeito na liberação do citocromo c a partir das mitocôndrias. No experimento, a artéria mesentérica superior foi ocluída durante 60 minutos e realizada reperfusão 60 minutos seguintes. Os ratos foram pré-tratados com injeção intraperitoneal dos inibidores da iNOS, tais como *N-nitro-L-arginine methyl*

esteraminoguanidine (1S,5S,6R,7R) - 7 - chloro - 3 - imino - 5 - methyl-2-azabicyclo e heptane hydrochloride. A quantidade da iNOS sintase, caspase-3 e citocromo c foi determinada pelo método Western blot. A atividade da desidrogenase epitelial mitocondrial da mucosa intestinal foi verificada utilizando o método que inclui o uso da substância 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide. A I/R no intestino aumentou a apoptose da mucosa intestinal, a quantidade da iNOS sintase e a liberação do citocromo c, mas não alterou a quantidade da caspase-3. Os inibidores da iNOS atenuaram de forma significativa a apoptose da mucosa intestinal e a liberação do citocromo c. A disfunção mitocondrial induzida pela I/R intestinal foi melhor nos experimentos em que se usaram os inibidores da iNOS sintetase. Esses resultados indicaram que a iNOS sintase está relacionada com a apoptose da mucosa intestinal após I/R, fato este que pode ser parcialmente explicado pela liberação do citocromo c a partir da mitocôndria para sua matriz citosol.

Xia, Martin, Besner (2003); Pawlik et al. (2011); Sparkes et al. (2010); Takamori et al. (1989); Teruya (2006) examinaram as alterações inflamatórias, se o fator de crescimento epitelial ligado à heparina (HB-EGF), uma molécula intestinal citoprotetora, exerce seus efeitos por meio da expressão da molécula de adesão e do infiltrado de células inflamatórias, que são considerados importantes mediadores na patogênese da I/R intestinal. Os danos totais causados pela I/R em ratos foram causados pela oclusão da artéria mesentérica superior durante 90 minutos, seguida de reperfusão tecidual. Os ratos foram tratados com 600_g/kg de HB-EGF na região intraluminal, e os controles com PBS durante 45 minutos após o início da isquemia. Vinte e quatro horas após a I/R intestinal, o íleo foi retirado e processado para detecção imunohistoquímica de *P-/E-selectins*, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1)/*vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), células polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e macrófagos. Os resultados mostraram que as *P-/E-selectins* foram detectadas de forma significativa no endotélio após 4 horas da I/R quando comparada com o intestino normal. O tratamento com o HB-EGF diminuiu significativamente a expressão das *P-/E-selectins*. Entretanto, foi observado um aumento da expressão da molécula celular de adesão ICAM-1 e VCAM-1. Finalmente, a I/R causou uma significativa infiltração dos PMN e macrófagos no tecido após 24 horas, em comparação com o intestino normal, mas o tratamento com HB-EGF diminuiu significativamente, posteriormente, a número dessas células.

Os autores concluíram que a citoproteção promovida pelo uso do HB-EGF intestinal diminuiu, em parte, a regulação da expressão das moléculas de adesão e a infiltração pelas células inflamatórias citadas.

Brahmbhatt et al. (2013); Walensi et al. (2013); Peres et al. (2012); Santos et al. (2012) verificaram a possibilidade de diminuir os danos causados pela I/R intestinal usando-se a sinvastatina, hidroxietilamido e/ou alguns antioxidantes, como: vitamina C, manitol e *N*-acetilcisteína. Os estudos foram realizados em coelhos vermelhos machos da Nova Zelândia, os quais foram divididos em seis grupos de oito animais cada um. No grupo 1, cinco segmentos do intestino delgado foram retirados para estudos histopatológicos (intestino normal). No grupo 2, segmentos do intestino delgado também foram usados para estudos histopatológicos após 3 horas da oclusão da artéria mesentérica superior (isquemia intestinal). No grupo 3, após 3 horas da oclusão da artéria mesentérica superior, realizou-se 1 hora de reperfusão tecidual. Nesse grupo, o fluxo sanguíneo foi medido na artéria citada, durante os primeiros 30 minutos e, novamente, segmentos do intestino delgado foram retirados para futuros estudos histopatológicos após 60 minutos da realização da reperfusão intestinal. Nos grupos 4, 5 e 6, os procedimentos foram similares aos do grupo 3, mas, adicionalmente, os animais receberam por via endovenosa os seguintes antioxidantes: vitamina C, 250 mg/kg para o grupo 4; 20% de manitol no grupo 5 (3 ml/kg); e 100 mg/kg de *N*-acetilcisteína no grupo 6. Os resultados mostraram que os antioxidantes escolhidos tiveram efeito benéfico sobre o fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior. O fluxo sanguíneo nos grupos que receberam antioxidantes, após 30 minutos da reperfusão mostrou melhores valores iniciais, de 53% a 57%, que os 27% do grupo 3. As avaliações histopatológicas mostraram que houve ação antioxidante da vitamina C e do manitol. A aplicação desses antioxidantes diminuiu os danos teciduais no intestino delgado desse grupo de animais após reperfusão, a qual foi realizada ao término das 3 horas da oclusão da artéria mesentérica superior.

Moeser et al. (2006) citam que o trato gastrointestinal é revestido por uma simples camada de epitélio, que atua como uma excelente barreira seletiva, permitindo um eficiente transporte de nutrientes e água e prevenindo a entrada para o lúmen intestinal de microrganismos potencialmente patogênicos. A falha nessa barreira é caracterizada pelo aumento da permeabilidade intestinal, que precede o início de um grande número de alterações intestinais agudas inclusive isquemia intestinal aguda ou crônica.

Gomes et al. (2011) avaliaram as alterações histopatológicas da mucosa intestinal de coelhos submetidos à I/R, com e sem pré-condicionamento isquêmico. Foram estudados dois grupos de dez coelhos da Nova Zelândia, machos, com peso corpóreo variando entre 2,2 e 3 kg (média de 2,5 kg). Para indução da isquemia em todos os animais, o intestino delgado e o mesentério foram seccionados 30 cm e 60 cm após a transição pilórica gastroduodenal, antes da oclusão da artéria mesentérica cranial. Nos animais do grupo 1, a artéria mesentérica proximal foi ocluída por pinçamento atraumático durante 45 minutos, seguidos de reperfusão por 30 minutos. No grupo 2, foi realizado pré-condicionamento por três ciclos de 2 minutos de oclusão mesentérica intercalada com três ciclos de 2 minutos de reperfusão, seguida de oclusão mantida por 45 minutos e reperfusão de 30 minutos como no grupo 1. Para o estudo histopatológico, foram obtidas biópsias da parede intestinal antes da isquemia (t0-controle), após 45 minutos de isquemia (t1) e após 30 minutos de reperfusão (t2). Os resultados mostraram que no grupo 1 foram observados os seguintes graus de lesões: t1, média de 2,8 e t2, média de 3,3. Foram significativas as diferenças entre t0 e t1 e t0 e t2, mas não foram significativas as variações entre t1 e t2 ($p > 0,05$). No grupo 2, obteve-se em t1 a média de 2,6 e em t2 a média de 2,1. Foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre t0 e t1, t0 e t2 e entre t1 e t2. Não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados de t1 nos dois grupos, mas foram significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os resultados histopatológicos das biópsias de t2 dos grupos 1 e 2. Os autores concluíram que o pré-condicionamento isquêmico reduziu significativamente a alteração histopatológica determinada pela reperfusão pós-isquêmica da parede intestinal.

Topcu et al. (2007) investigaram se o Misoprostol[®], um tipo de prostaglandina sintetizada e análoga ao PGE1, teria algum efeito sobre a prevenção da apoptose quando ocorrem as alterações teciduais nos processos de I/R intestinal induzidos experimentalmente. Trinta ratos albinos Wistar machos e adultos foram selecionados, ficaram em jejum durante 18 horas antes do início do experimento, mas puderam beber água até 30 minutos antes da laparotomia. Todo o processo cirúrgico foi sempre realizado entre 10 e 11 horas da manhã. Esses 30 animais foram distribuídos em três grupos: grupo I cuja laparotomia foi realizada sem realização dos processos I/R e o animal recebeu solução salina no lugar do Misoprostol[®]; grupo II que sofreu laparotomia mais os processos I/R e usou-se ainda

salina no lugar do Misoprostol®; e o grupo III que foi submetido à laparotomia e aos processos I/R, tendo recebido o Misoprostol®. O Misoprostol® (50 mg/kg/d) foi administrado como uma “refeição intragástrica”, ou seja, por via parenteral, durante três dias. Espécimes de tecido do íleo terminal foram coletados para estudos histológicos e bioquímicos. As células apoptóticas foram detectadas usando-se o sistema de reações abreviado como TUNEL em língua inglesa, conforme as letras grifadas em negrito que estão entre parênteses (***T**erminal deoxynucleotidyl **t**ransferase-mediated **d**UTP **N**ick **E**nd-**L**abelled*). As análises imunohistoquímicas foram realizadas para determinar a distribuição da iNOS e a sintase induzida do óxido nítrico endotelial (eNOS). As amostras foram analisadas pelo método malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD) e *glutathione* peroxidase (GSH-Px). O número de células positivas para o sistema TUNEL foi mais alto no grupo II quando comparado com os outros dois grupos ($p<0.05$). No grupo III, esse valor foi mais alto quando comparado com o grupo I e mais baixo quando comparado com o grupo II ($p<0.05$). A imunorreatividade para a iNOS não foi detectada nos cortes histológicos do grupo I, mas foi moderadamente imunorreativa no grupo II e levemente imunorreativa no grupo III. A imunorreatividade da eNOS foi moderada nos cortes histológicos do íleo em todos os três grupos. Usando-se método MDA no íleo, este mostrou reações mais intensas que no grupo II em comparação com o grupo I ($p<0.05$), mas não mostrou diferença em relação ao grupo III. A superóxido dismutase não mostrou diferença quanto a sua reatividade nos grupos I e III, mas foi significativamente mais reativa no grupo II ($p<0.05$). Nesse modelo experimental de indução de I/R para obter alterações no intestino, a apoptose foi verificada em relação aos enterócitos, mas os autores puderam demonstrar que o Misoprostol® diminuiu a apoptose dessas células nesse modelo experimental. Os resultados dessa pesquisa indicaram que o Misoprostol® pode ter um papel-chave nos eventos fisiopatológicos que promovem as falhas intrínsecas da barreira de defesa na isquemia e reperfusão do epitélio intestinal.

Cámara-Lemarroy et al. (2010) investigaram o efeito da talidomida sozinha ou em associação com pentoxifilina, em relação aos seus efeitos sobre o tecido intestinal de ratos submetidos ao processo I/R. Vinte ratos machos Wistar foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos: no grupo 1 (Sham), uma operação simulada foi realizada; o grupo 2 foi o grupo-controle; o grupo 3 recebeu apenas talidomida como tratamento (400 mgkg⁻¹) (THAL); o grupo 4 recebeu tratamento

apenas com pentoxifilina (PTX 50 mg.kg⁻¹); e o grupo 5 recebeu uma combinação de tratamento com talidomida e pentoxifilina (THAL + PTX). O processo I/R foi induzido por clampeamento da artéria mesentérica superior durante 45 minutos, seguido por 120 minutos de reperfusão. Mediu-se no soro a concentração de aspartato-aminotransferase (AST), lactato-desidrogenase (LDH), fator de necrose tumoral alfa (TNF), assim como a peroxidação dos lipídeos e seu *status* antioxidante. Amostras de intestino foram morfológicamente analisadas e a proporção do edema foi medido em amostras secas e úmidas tanto do intestino como pulmão e fígado. Os resultados mostraram que as concentrações de AST, LDH e TNF-alfa estavam aumentadas em todos os grupos após I/R quando comparadas com o grupo-controle e o grupo experimento ($p<0,05$), assim como a peroxidação dos lipídeos, mas a capacidade antioxidante do soro foi diminuída ($p<0,05$). A proporção do edema nas amostras secas e úmidas foi elevada em todas as amostras ($p<0,05$). Tanto a talidomida como a pentoxifilina reduziram efetivamente os níveis de AST, LDH, TNF-alfa, os níveis de peroxidação dos lipídeos, e atenuaram o edema do tecido intestinal induzido pelo processo I/R ($p<0,05$). O tratamento que combinou talidomida e PTX mostrou efeitos modestos no pulmão em relação aos níveis de TNF-alfa. Os autores concluíram que as duas drogas protegeram o tecido intestinal, pulmonar e hepático contra as injúrias do processo I/R intestinal, provavelmente pela inibição dos níveis de TNF-alfa no soro e pela peroxidação dos lipídeos. Entretanto, a combinação de tratamentos não mostrou resultados significativos.

Sparkes et al. (2010) induziram o processo I/R no intestino de camundongos, e os resultados mostraram danos teciduais significativos nos animais selvagens, o que não ocorreu com os animais deficientes para o anticorpo *Rag-1(-/-)*. Entretanto, esses animais *Rag-1(-/-)* mantiveram os danos intestinais após administração de anticorpos dos animais selvagens, como se verificou quando do uso do anticorpo monoclonal específico e relacionado com o antifosfolípídeo, sugerindo envolvimento do antígeno formado por lipídeo. A hipótese dos autores foi que o processo I/R inicia-se o metabolismo dos lipídeos nas células, resultando na produção de um antígeno que é reconhecido pelo anticorpo monoclonal antifosfolípídeo. Em vários momentos, tanto no grupo-controle como no grupo que sofreu I/R, os lipídeos extraídos das amostras do jejuno do animal foram analisados por meio da espectroscopia de massa, especificamente denominada como *electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry*. Durante 15 minutos de reperfusão,

ocorreu uma indução significativa da lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilglicerol e da produção de ácido aracdônico livre, em comparação com o tratamento realizado no grupo-controle. Enquanto os níveis de lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilglicerol e ácido aracdônico livre foram similares nos animais selvagens e nos animais deficientes Rag-1(-/-), o processo promoveu ativação do nível do mRNA Cox-2 e produção de da prostaglandina E_2 nos animais selvagens, mas não nos animais deficientes. A administração dos anticorpos dos animais selvagens nos animais deficientes restaurou a produção de PGE_2 e danos teciduais no intestino. Esses dados indicaram que o processo I/R para induzir danos teciduais no intestino necessita da estimulação pelo mRNA Cox-2 para produzir PGE_2 , mas não para produzir lisofosfatidilcolina e produção de ácido aracdônico livre.

Bulbuloglu et al. (2011) associaram a hipoperfusão visceral e as alterações do processo I/R com o estresse oxidativo do intestino. Estudaram os efeitos do condicionamento na pré e pós-laparoscopia usando zinco, pentoxifilina e N-acetilcisteína como marcadores das alterações teciduais provocadas pela I/R do intestino delgado, em um modelo animal. Utilizaram 56 ratos machos Sprague-Dawley, distribuídos ao acaso, em grupos de tratamento numerados de 1 a 7, um grupo-controle e seis experimentais. Exceto para o grupo 7 (grupo-controle), foi realizada uma cirurgia para indução do pneumoperitônio por meio do insuflamento de dióxido de carbono sob a pressão de 15 mmHg. No grupo 1, a laparoscopia para I/R foi submetida a 60 minutos de pneumoperitônio. No grupo 2, foi realizada uma laparoscopia pré-condicionadora e depois a laparoscopia propriamente dita, com 5 minutos de insuflamento seguido por 60 minutos de pneumoperitônio. No grupo 3, foi realizada a laparoscopia mais laparoscopia pós-condicionadora de 60 minutos e pneumoperitônio provocado por 5 minutos de insuflamento e 5 minutos de desinsuflamento. O grupo 4 recebeu injeção intraperitoneal de zinco ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); o grupo 5, pentoxifilina e o grupo 6, uma única injeção intraperitoneal de zinco-pentoxifilina ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ou N-acetilcisteína ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), respectivamente, 5 minutos antes do período de desinsuflamento. Os animais foram sacrificados no final dos experimentos. Amostras do intestino delgado foram testadas para malondialdeído (MDA), catalase (CAT), *glutathione* peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD). Os resultados não mostraram diferenças significativas para os níveis de MDA entre os grupos 1, 2 e 3. Entretanto, os níveis de MDA foram significativamente mais altos nos grupos 1, 2 e 3 quando comparados com os grupos 4, 5, 6 e 7. Para os

níveis de SOD e GPX, o grupo 3 foi significativamente mais alto do que nos grupos 1, 2 e 4 em comparação com o grupo-controle (grupo 7). De acordo com os níveis de SOD, não houve diferença significativa entre os grupos 1, 2, 4 e controle. Os níveis de GPX do grupo 3 foram significativamente mais altos do que os do grupo 1, 2, 4 e controle. O nível de GPX do grupo 1 foi significativamente mais baixo do que o dos grupos 5 e 7. O nível médio de CAT dos grupos 1 e 2 foram significativamente mais baixo quando comparado com os grupos 3, 6 e grupo-controle. A média do nível de CAT no grupo 3 foi significativamente mais alta do que nos grupos 1, 2, 4 e controle. Os autores concluíram nesse modelo animal que as alterações causadas pelo processo I/R no intestino delgado mostraram que o zinco, a pentoxifilina e a N-acetilcisteína atenuaram significativamente os danos teciduais no intestino delgado submetido à isquemia, o que não ocorreu com o condicionamento realizado pela pré-laparoscopia e nem com a pós-laparoscopia, que, portanto, podem ser dispensáveis.

A apoptose é um processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, por causa da ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e altera o posicionamento de seus lipídios constituintes. Em células indenadas, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose, esse lipídio se expõe no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem o processo de degradação. Durante a apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos). Os restos celulares são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (PAROLIN, REASON, 2001).

Bussuan et al. (2010) avaliaram o marcador para apoptose celular Fas ligante (FasL) em um modelo de estresse oxidativo induzido pelo azoximetano (AOM) na cripta de cólon em ratos. Para isto, usaram 14 ratos Wistar distribuídos em dois grupos: controle (n=7) e AOM (n=7). O grupo AOM recebeu 5 mg/kg da droga e o grupo-controle recebeu solução salina aplicada pela via subcutânea. A coleta das amostras no colo proximal ocorreu após 3 horas da administração das substâncias nos dois grupos. A FasL foi quantificada pelo percentual nas seguintes áreas: no topo, base e toda a cripta do cólon intestinal. Os resultados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e *t* de Student ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que no grupo-controle não houve diferença significativa entre a expressão do FasL no topo ($10,75 \pm 3,33$) e base ($11,14 \pm 3,53$) da cripta ($p = 0,34293740$). No grupo AOM, não houve diferença significativa entre a expressão do FasL no topo ($8,86 \pm 4,19$), base ($8,99 \pm 4,08$) e cripta ($p = 0,78486003$). Entre o grupo-controle ($10,95 \pm 3,43$) e o grupo AOM ($8,92 \pm 4,13$), houve uma diferença significativa da expressão da FasL ($p = 0,026466821$), e uma redução significativa na expressão do FasL ocorreu no grupo-controle ($10,75 \pm 3,33$) e AOM ($8,86 \pm 4,19$) no topo da cripta ($p = 0,00003755$). Foi observada uma diminuição significativa no grupo-controle ($11,14 \pm 3,53$) e AOM ($8,99 \pm 4,08$) na base da cripta ($p = 0,00000381$). Os autores concluíram que o azoximetano induziu estresse oxidativo, o qual foi identificado pela diminuição significativa da expressão da FasL, embora não haja diferença significativa entre a base e a parte superior da cripta associada à ativação do consumo do FasL. O papel da proteína ligante Fas no estresse oxidativo induzido pelo azoximetano em criptas do colo de ratos. Bussuan et al. (2010) avaliaram o marcador de apoptose Fas ligante (FasL) em um modelo de estresse oxidativo induzido pelo azoximetano (AOM) na cripta de cólon em ratos. Concluíram que o azoximetano induziu o estresse oxidativo identificado pela diminuição significativa da expressão do FasL, embora não haja diferença significativa entre a base e parte superior da cripta associada à ativação de consumo do FasL.

Kanomata, em 2011, estudou quantitativamente, na expressão de FAS ligante pós-indução de estresse oxidativo em mucosa gástrica com administração de azoximetano em ratos, a quantificação da expressão de FAS-L pela imunohistoquímica, com uso de processamento de imagem assistida por computador na quantificação da expressão do biomarcador FAS ligante com o programa Adobe Photoshop®. Análise estatística da média de expressão de FAS

ligante com método de Mann-Wittman evidenciou aumento do Fas ligante nos grupos que utilizaram azoximetano em ratos. O autor concluiu que a expressão de FAS ligante aumentou em mucosa gástrica com administração de azoximetano. Evidenciado aumento da expressão de FAS ligante na terceira semana, 3 horas após a primeira administração de AOM, e na quinta semana.

Fator ativador de plaquetas promove apoptose da mucosa de intestino delgado de ratos via Fas ligante, caminho que ativa a cascata das proteases por meio da ativação da caspase 9 após o fenômeno da isquemia e reperfusão. Wu et al. (2002) utilizaram o fator ativador de plaquetas (PAF) como um mediador pró-inflamatório lípido para a resposta inflamatória. Não é claro se o PAF está envolvido no processo que é muito complexo na lesão da I/R, que a apoptose da mucosa do intestino delgado. A I/R intestinal de intestino delgado de ratos por 60 minutos pela oclusão da artéria mesentérica superior, seguida por uma reperfusão de 60 min. A I/R induziu apoptose da mucosa intestinal pela atividade do PAF, mas inibiu a atividade do PAF-acetil. Foram observados aumentos significativos na interleucina-6 (IL-6) e diminuições na expressão de IL-10. A análise Western *blot* mostrou que a I/R na ativação das plaquetas endoteliais, aumento da molécula-1 de adesão celular (PECAM-1) e as proteínas do Fas e ligante Fas (FasL), induziu aumento da liberação e ativação do citocromo c nas mitocôndrias pela ativação da caspase-9. O pré-tratamento do PAF com o antagonista BN-52021 atenuou essas mudanças, exceto o aumento do Fas ligante. Os resultados mostraram que a I/R da mucosa intestinal resultou em aumento de PAF activado. O PAF ativado aumentou na mucosa IL-6 e PECAM-1 e a expressão de FASL, mas não evitou a ativação do citocromo c na mitocôndria para ativar caspase-9. Essa descoberta sugere que o PAF, por meio do FASL induz apoptose da mucosa após I/R em intestino delgado de ratos. Fator ativador de plaquetas (PAF) é um mediador pró-inflamatório lípido para a resposta inflamatória. Mas ainda não é claro como o PAF está envolvido no processo muito complexo de isquemia-reperfusão, provocando a apoptose induzida na mucosa do intestino delgado. A I/R intestinal em ratos foi induzida por 60 minutos pela oclusão da artéria mesentérica superior, seguida por uma reperfusão de 60 min. I/R induziu apoptose da mucosa e atividade PAF, mas inibiu a atividade da PAF-acetil. Foram observados aumentos significativos na interleucina-6 (IL-6) e diminuições na expressão de IL-10. A análise Western *blot* mostrou que a I/R ativa molécula-1 de adesão celular (PECAM-1) nas plaquetas endoteliais e as proteínas

de Fas e ligante (FasL), aumentou a liberação de citocromo c de mitocôndrias induz ativação da caspase-9 ativando outras proteases da cascata da apoptose. O Pré-tratamento da PAF com antagonista BN-52021 atenuou essas mudanças, exceto o aumento do FasL. Os resultados mostraram que na I/R o antagonista BN-52021 do PAF-acetil- resultou numa redução de PAF ativado. No entanto o PAF ativado aumentou na mucosa IL-6 e PECAM-1, aumentando a expressão FASL, e levou à ativação e a liberação de citocromo c na mitocôndria para ativar caspase-9. Esse achado sugere que PAF promove a apoptose da mucosa após I/R em intestino delgado de ratos em parte por meio de FASL pela mediação da caspase-9, caminho para ativar as proteases da cascata da apoptose em mucosa intestinal após o processo da isquemia e reperfusão intestinal (WU et al., 2002).

Jing et al. (2008) desenharam um estudo em ratos para determinar a função do PAF e o FTN (TNF) que participam da modulação da apoptose intestinal pela via extrínseca pela proteína ligante conhecida como proteína da morte celular que se encontra na membrana celular. Em qualquer situação de agressão celular, a isquemia e reperfusão são ativadas formando um imunocomplexo com o anticorpo anti-Fas ligante e induzem apoptose celular pela via extrínseca ativando uma cascata de proteases que são as caspases nas epiteliais, podendo provocar a morte celular pela apoptose. Assim, o anti-Fas ligante pode ser utilizado como marcador para análise de apoptose, podendo esta ser medida e avaliada por vários métodos de informática (*software*) ou contagem visual das células em cor marrom, pois o anti-Fas ligante marca as células apoptóticas em coloração marrom. Inclusive este método foi utilizado na análise imuno-históquímica da presente pesquisa.

Assis (2012); Asisis et al. (2013) utilizaram o biomarcador anti-FAS ligante em testículos de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia e reperfusão. A expressão do FAS ligante (FASL) em células sertoli de testículos de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia/ reperfusão foi quantificada com objetiva de 40x no campo microscópico para facilitar a contagem visual das células coradas em marrom mostrando que este marcador foi factível para identificar a morte celular por apoptose após isquemia e reperfusão tecidual de testículos de ratos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

1. Avaliar os mecanismos de proteção tecidual da isquemia/reperfusão em intestino delgado de ratos.

3.2 Específicos

1. Avaliar a ação da pentoxifilina e da prostaglandina E1 no fenômeno de isquemia e reperfusão em intestino delgado de ratos.
2. Identificar as lesões histológicas pelos critérios de Chiu no fenômeno isquemia e reperfusão do intestino delgado de ratos
3. Avaliar apoptose celular pela imunohistoquímica com o biomarcador anti-Fas ligante em intestino delgado de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia e reperfusão.

4. MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Brasil; protocolo número 308 e foi executado no Laboratório de Técnica Cirúrgica Experimental da UFMS no período de janeiro a dezembro de 2012.

Foram utilizados trinta e cinco ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, albinos, machos, adultos, com peso médio de 260 g. Os animais foram mantidos em caixas com cinco ratos alojados em estantes ventiladas com temperatura e umidade controladas e ciclo de luz de 12 h claro e escuro no Laboratório de Modelo Animal e Cirurgia Experimental do Biotério Central da UFMS.

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Disciplina de Técnica Cirúrgica Experimental por sete dias, para observação e adaptação, previamente aos procedimentos operatórios aos quais foram submetidos. Receberam ração balanceada própria para a espécie e água *ad libitum*. Os animais ficaram alojados em gaiolas de metal, com dimensões de 40 cm x 30 cm x 25 cm, com no máximo cinco animais por gaiola, sob as condições de iluminação controlada, com ciclo de luz de 12 h claro e escuro e temperatura ambiente variando de 19°C a 37°C e higienização diária.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Grupo A (n=10), Grupo B (n=10) e Grupo C (n=10), segundo o tipo de procedimento experimental e fármacos utilizados e o Grupo D (n=5), grupo simulado ou Sham (Figura 4).

Grupo A - GA (n=10) Isquemia e reperfusão tecidual: dez ratos foram submetidos à isquemia intestinal por 60 minutos, por oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular, seguida por reperfusão durante 60 minutos.

Grupo B (n=10): isquemia e reperfusão com pentoxifilina: dez ratos foram submetidos ao procedimento de isquemia intestinal por 60 minutos por oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular, seguida por reperfusão durante 60 minutos com uso da pentoxifilina com 40 mg.kg⁻¹, distribuída em 20 mg.kg⁻¹ três minutos antes do início do período de isquemia e 20 mg.kg⁻¹ três minutos antes do início do período de reperfusão.

Grupo C (n=10): isquemia e reperfusão com prostaglandina E1: dez ratos foram submetidos ao procedimento de isquemia intestinal por 60 minutos por

oclusão da artéria mesentérica cranial com clampe vascular, seguida por reperusão durante 60 minutos com uso de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ prostaglandina E1(PGE1), distribuídos $2,5 \mu\text{cg.kg}^{-1}$ três minutos antes do início do período de isquemia e $2,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ três minutos antes do início do período de reperusão. A PGE1 contém $20 \mu\text{cg}$ de Alprostadil®, sendo apresentada sob a forma liofilizada. A diluição foi feita em 5 ml de água destilada, obtendo-se assim uma solução com concentração de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Grupo D (n=5 ratos) grupo simulado ou grupo Sham: todos os animais foram submetidos aos procedimentos dos grupos experimentos, ou seja, submetidos à analgesia, anestesia e laparotomia sem o clampeamento da artéria mesentérica e nem com uso de drogas.

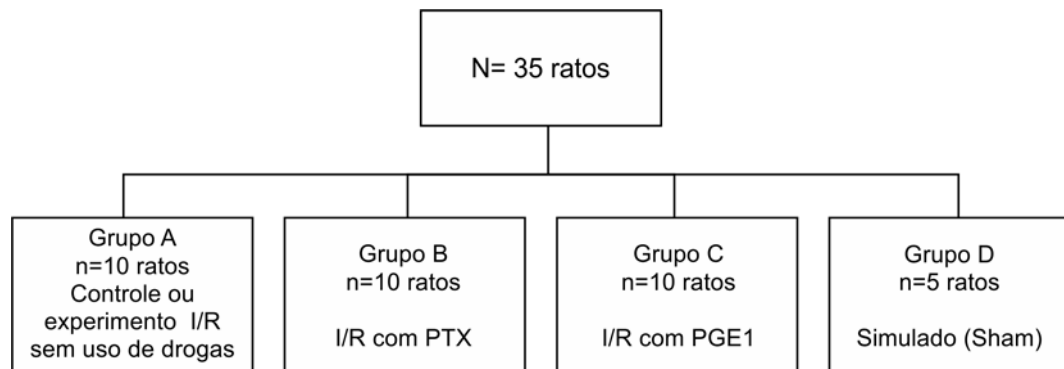


Figura 4 - Esquema representativo da distribuição dos grupos.

4.1 Ambiente

Local da experimentação: Laboratório de Cirurgia Experimental da UFMS. Condições de alojamento: os animais foram alojados em salas exclusivas com ambiente adaptado às necessidades da espécie como citado anteriormente. Temperatura entre 18 e 27°C. Umidade relativa do ar entre 40% e 70%. Ciclos de luz–escuridão de 12/12 h, com intensidade luminosa de 323 lumes/m^2 . Trocas ar fresco e filtrado, com média de dez trocas completas por hora. Instituição: Biotério da UFMS, período de adaptação: sete dias(Figura 5)

Condições de confinamento: quatro animais em cada caixa de polipropileno apropriada para a espécie (16 cm x 46 cm x 34 cm), proporcionando espaço mínimo de 250 cm^2 para cada animal, tampas de malhas metálicas de $1,6 \text{ cm}^2$, com camas de maravalhas (madeira), colocadas em estantes a 1 m acima do piso.

Alimentação: *ad libitum* com água em bebedouros de vidros suspensos com bicos de ponta reta, e ração “peletizada”, própria para a espécie (teor proteico de 20% a 27%).



Figura 5 - Foto do confinamento dos animais.

4.2 Procedimentos

Isolamento dos animais em caixas de polipropileno, em sala anexa à sala operatória, por um período de três horas, com a finalidade de diminuir o estresse pré-operatório dos animais. Pesagem dos animais.

4.2.1 Pré-operatório

Tricotomia do terço inferior do abdômen com tosquiador elétrico. Assepsia com escova de cerdas macias embebidas em iodopirrolidona tópica 2% e enxague com solução salina 0,9% (Figura 6).

4.2.2 Anestesia dissociativa

Solução de 2:1 de cloridrato de cetamina[®] (50.mg/mL⁻¹) e xilazina[®] (20mg/mL⁻¹) na dosagem de 0,1 mL/100g⁻¹ de peso, administrado por via intraperitoneal. O plano anestésico foi constatado com o decúbito dorsal e não à reação à dor.

4.2.3 Analgesia

A analgesia foi realizada com Nalbufina (Nubain[®]), administrada na dose 2 mg/kg⁻¹, por via subcutânea com o objetivo de reduzir dor durante o tempo em que os animais permaneceram acordados na isquemia e reperfusão tecidual, após a recuperação anestésica que ocorre em aproximadamente 20 minutos após início da anestesia.



Figura 6 - Foto do animal anestesiado e após a tricotomia.

4.2.4 Operação (Figuras, 6, 7, 8 e 9)

Em decúbito dorsal, antissepsia com álcool iodado 2%, colocação dos panos operatórios para isolamento do abdômen. Incisão longitudinal na linha média do abdômen laparotomia mediana xifopúbica, com 30 mm de comprimento, sendo dissecada, primeiro, a pele, depois o tecido celular subcutâneo e aberto a linha Alba, com lâmina de bisturi nº 15 e tesoura curva, para exposição da cavidade abdominal, exteriorização do intestino delgado, identificação e dissecação da artéria mesentérica cranial. Essa artéria foi ocluída por clampe vascular atraumático que permaneceu durante sessenta minutos (fase de isquemia). Após a colocação do clampe, o intestino delgado foi reposicionado na cavidade abdominal e a ferida operatória foi fechada com sutura contínua da pele com fio de poliamida 3.0.

4.2.5 Procedimento operatório de reperfusão

Animal sob a anestesia na mesma dose, posicionado em decúbito dorsal na mesa operatória; antissepsia com polivinilpirrolidona (PVPI - Povidine®). Colocação dos panos operatórios esterilizados isolando-se o campo operatório, secção do fio de poliamida 3.0, retirada da sutura com reabertura da cavidade abdominal. Afastamento das alças intestinais e identificação do clampe vascular que foi aberto e retirado. Acomodação das alças intestinais na cavidade abdominal. Após a realização do período de reperfusão estabelecido, os animais foram anestesiados novamente para a coleta de material e sacrificados por meio da exanguinação após secção da aorta com o animal anestesiado.



Figura 7 - Foto das alças intestinais isquemiadas (macroscopia) após a abertura da cavidade e com a presença de clampe vascular traumático.

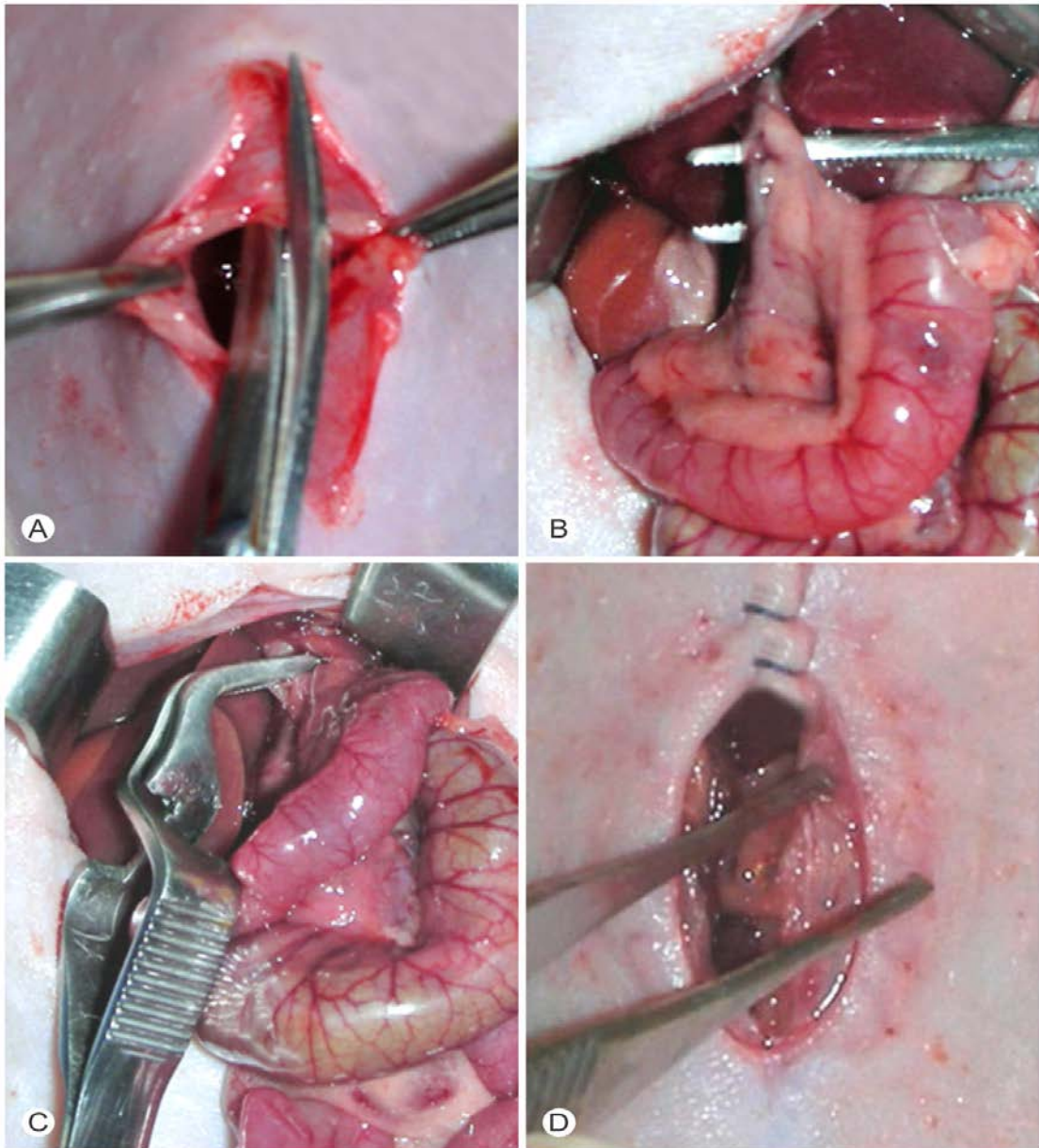


Figura 8 - Fotografias mostrando as etapas do procedimento cirúrgico: A - laparotomia mediana; B - artéria mesentérica cranial isolada; C - oclusão da artéria mesentérica cranial por aplicação de clampe vascular; D - síntese da parede do abdômen.

Completada a fase de reperfusão, os animais dos três grupos experimentais e do simulado foram novamente anestesiados, com a mesma dose aplicada para o período de isquemia e de reperfusão, e a parede abdominal foi novamente aberta para remoção do fio de sutura. A seguir foi ressecado um segmento de aproximadamente 2 cm centímetro do íleo, a cinco centímetros proximal à transição ileocecal, o qual foi lavado com solução salina e formaldeído a 10% e colocado para

fixação em solução de formol tamponado a 10% para posterior processamento histológico e imunohistoquímico.

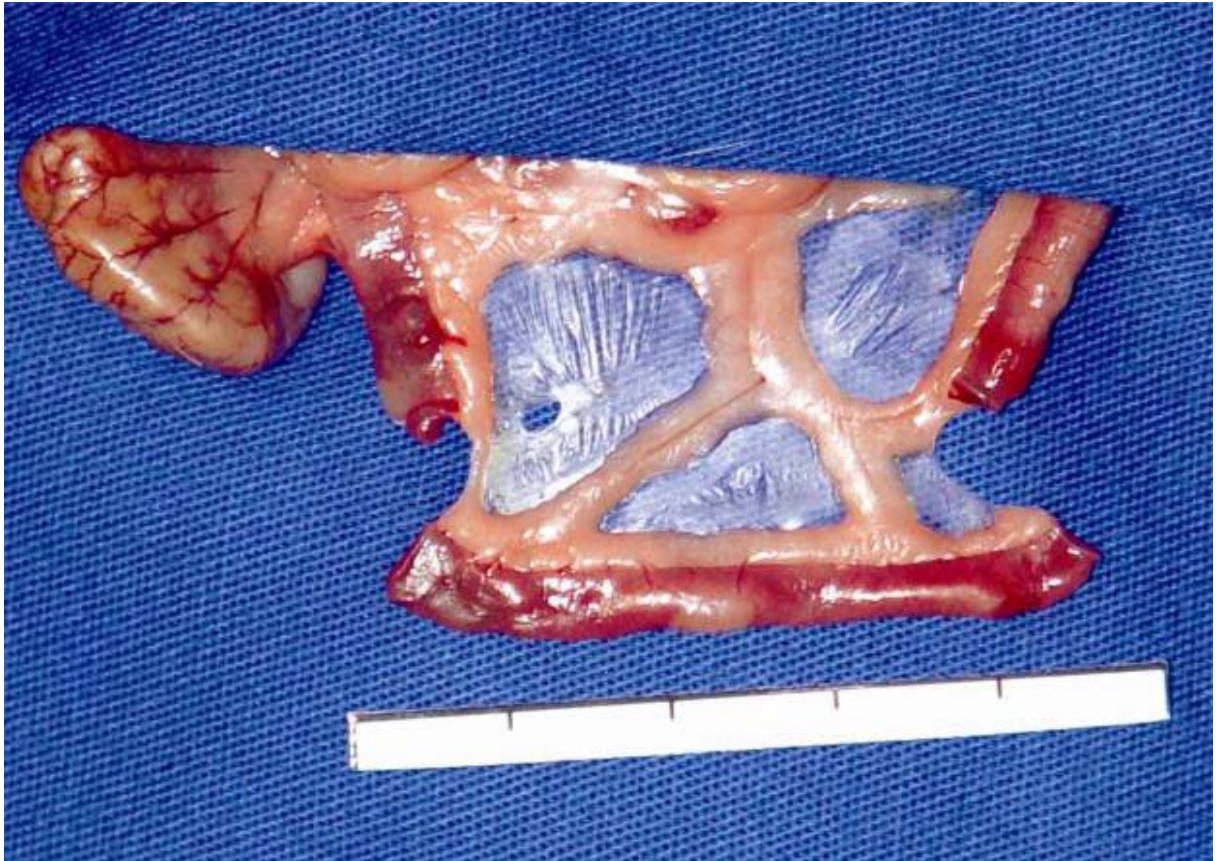


Figura 9 - Foto mostrando o segmento de íleo terminal seccionado a 50 mm da junção ileocecal e desse segmento foram retirados 20 mm de extensão, prontos para ser imerso na solução de fixação de formalina tamponada 10%.

4.2.6 Processamento histológico

Processamento técnico dos tecidos: Foi realizada a desidratação em álcoois etílicos sucessivamente, em concentrações crescentes, até o álcool absoluto. Após realizar a diafanização com xilol, realizou-se a impregnação com parafina. Inclusão e moldagem do bloco de parafina: o tecido foi colocado em caixas apropriadas com parafina e cera de abelha a 5%, em temperatura de cerca de 60°, adequadamente identificadas e resfriadas à temperatura ambiente.

Microtomia: usou-se o micrótomo rotativo para realizar cortes finos de cerca de 5 µm e montados sobre lâmina de vidro liso com uma área fosca, devidamente identificada. Desparafinização: os cortes montados e identificados foram

desparafinizados, permanecendo em estufa a 56°C para retirada da parafina excedente. Coloração com hematoxilina e eosina (HE): desparafinização com xilol, hidratação com álcoois sucessivos, em concentrações decrescentes. Lavagem em água corrente. Corada com hematoxilina por 5 a 10 minutos. Retirado o excedente do corante com água comum e desidratada rapidamente em álcool absoluto. A seguir foi usado o corante eosina por 8 minutos. Nova passagem em sucessivos álcoois em concentrações crescentes. Diafanização com xilol e montagem da lâmina com lamínula para cobertura e bálsamo do Canadá e Etela para colagem dela. As lâminas foram analisadas pela microscopia óptica (Microscópio Nikon® E 600 de 100x), por um patologista, o qual não tinha prévio conhecimento sobre o grupo experimental do qual cada rato foi proveniente.

A avaliação histológica das lesões da mucosa de intestino delgado dos ratos foi realizada segundo os critérios de Chiu et al., (1970), usando escores determinados para tal fim(Figura 1)

4.2.7 Processamento imunohistoquímico (Figuras 2 e 3)

O processamento imunohistoquímico (técnica avidin-biotin complex, ABC) foi realizado no laboratório Screenlab®, com a utilização de anticorpo primário anti-FAS ligante (epítipo terminação – N20, Santa Cruz®, produto SC834, lote A1812, diluição 1:100), anticorpo secundário Dako LSAB® (produto K0609, lote 10055833) e revelador de cor DAB (diamino + benzidina) Dako® (produto K3468, lote 10029914, diluição 1:10), com imunopositividade da expressão do biomarcador anti-FAS ligante, na coloração marrom. Foi realizado processamento imunohistoquímico para marcação do anticorpo anti-FAS ligante e mensuração da apoptose celular por contagem visual das células marcadas em coloração marrom nas células das vilosidades e criptas da mucosa de intestino delgado de ratos (JING et al., 2008; BUSSUAN et al., 2010; KANOMATA, 2011; ASSIS, 2012; MARKS, 2007; PAROLIN, REASON, 2001; KAPLOWITZ, 2000).

4.2.8 Captura das imagens para análise imunohistoquímica

Foi utilizado, para leitura das lâminas, o microscópio LEICA, modelo DM 500, com dupla cabeça, acoplado com câmera digital LEICA ICC 50 HD, com LAS

Software Version 4.0.0, 2011, com conexão ao *notebook* Dell XPS/M13 GHz, 3582 MB RAM e sistema operacional Microsoft Windows Vista® Ultimate.

4.2.9 Critérios de avaliação e quantificação da imunohistoquímica

O patologista selecionou quatro criptas em cada lâmina previamente escolhida aleatoriamente e marcada para cada animal de cada grupo (A, B, C, D), e denominadas da esquerda para a direita do campo microscópico em a, b, c e d. Processou-se a imagem com uma objetiva de 40x para facilitar a contagem visual das células coradas em marrom que dão a expressão imunohistoquímica do anti-FAS ligante, identificando-se aquelas células com imunoexpressão fortemente positiva para o FAS-ligante (Figuras 13, 14, 15 e 16).

As células coloridas em marrom pelo marcador anti-Fas ligante expressaram a apoptose e foram contadas nas quatro criptas escolhidas da esquerda para direita em a, b, c e d em cada lâmina, que representa um animal de cada grupo experimento. Em seguida, foi realizada uma média das células em marrom em cada cripta de cada animal do grupo. Finalmente, foram somadas as quatro médias do grupo e divididas pelo número de quatro criptas para calcular a média final e fazer o tratamento estatístico da análise imunohistoquímica.

4.2.10 Análise estatística da histologia

Os dados foram tabulados no *software* Excel 2010 e analisados estatisticamente no *software* BioEstat 5.0 e GraphPad Prism 4.0.

Foi testada a hipótese de diferença da classificação de Chiu e análise imunohisquímica para os grupos-controle, PTX, PGE1 e Sham. Os grupos foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

4.2.11 Análise estatística da imunohistoquímica

Os dados foram tabulados no *software* Microsoft Excel 2007 e analisados estatisticamente no *software* BioEstat 5.0.

Inicialmente foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov (compara o grau de concordância entre a distribuição acumulada de um conjunto de valores de amostra com a distribuição teórica acumulada esperada). Para os dados analisados se aceita a hipótese de concordância entre os valores acumulados e os valores teóricos esperados.

4.2.12 Teste de hipóteses

H0 = Não há diferença entre os grupos em relação à expressão do anti-FAS ligante.

H1 = Há diferença entre os grupos em relação à expressão do anti-FAS ligante.

Teste: Análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey.

Nível de decisão $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da análise histológica

Tabela 1 - Análise histológica apresentando a classificação de Chiu para o grau de lesão da mucosa intestinal dos indivíduos submetidos à isquemia e reperfusão de intestino delgado.

N	Controle	PTX	PGE1	Sham
1	4	3	1	0
2	5	1	3	1
3	3	3	2	0
4	5	3	2	1
5	4	3	3	0
6	2	3	2	
7	3	2	2	
8	4	3	3	
9	5	2	2	
10	5	2	1	
Média±dp	4,0±1,1	2,5±0,7	2,1±0,7	0,4±0,5

Testada a hipótese de diferença da classificação de Chiu e análise imunohisquímica para os grupos-controle, PTX, PGE1 e Sham. Os grupos foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

Os valores da classificação de Chiu foram estatisticamente maiores para o grupo-controle ($4,0 \pm 1,1$) em relação ao grupo PTX ($2,5 \pm 0,7$), o grupo PGE1 ($2,1 \pm 0,7$) e o grupo Sham ($0,4 \pm 0,5$), $p = 0,0001$. Entre os grupos PTX e PGE1 não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), conforme Gráficos 1 e 2.

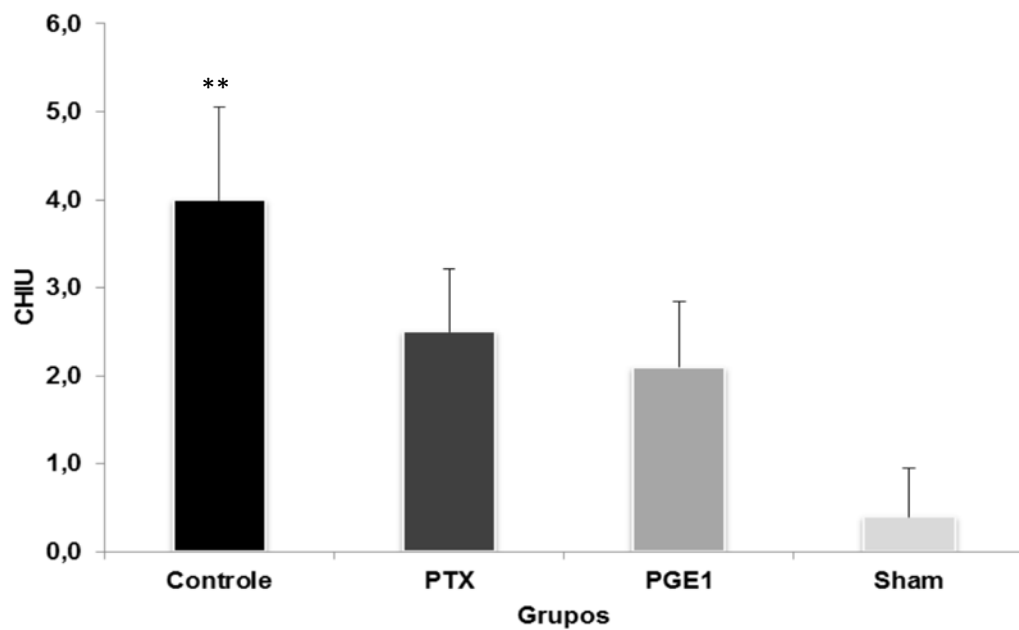


Gráfico 1 - Classificação de Chiu (grau de lesão da mucosa intestinal) para os grupos-controle, PTX, PGE1 e Sham. Valores expressos em média e desvio-padrão. (**) $p < 0,05$.

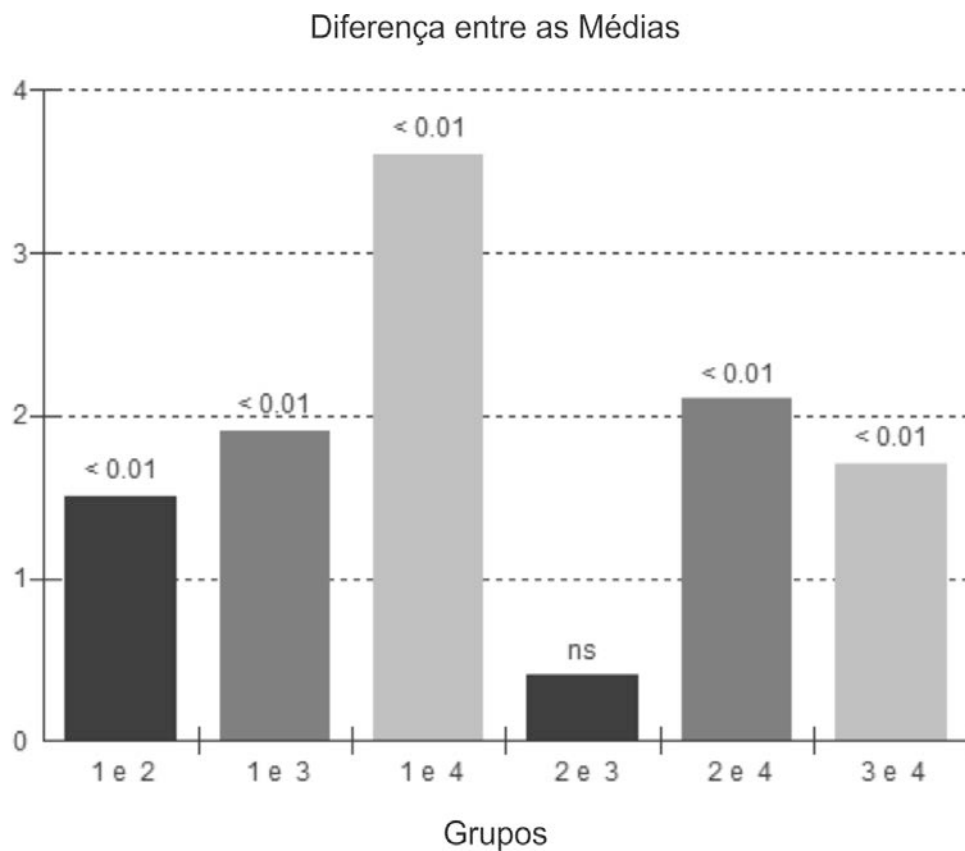


Gráfico 2 - Diferença das médias na análise da variância ANOVA com pós teste de Tukey. (1) Controle; (2) PTX; (3) PGE1; (4) Sham.

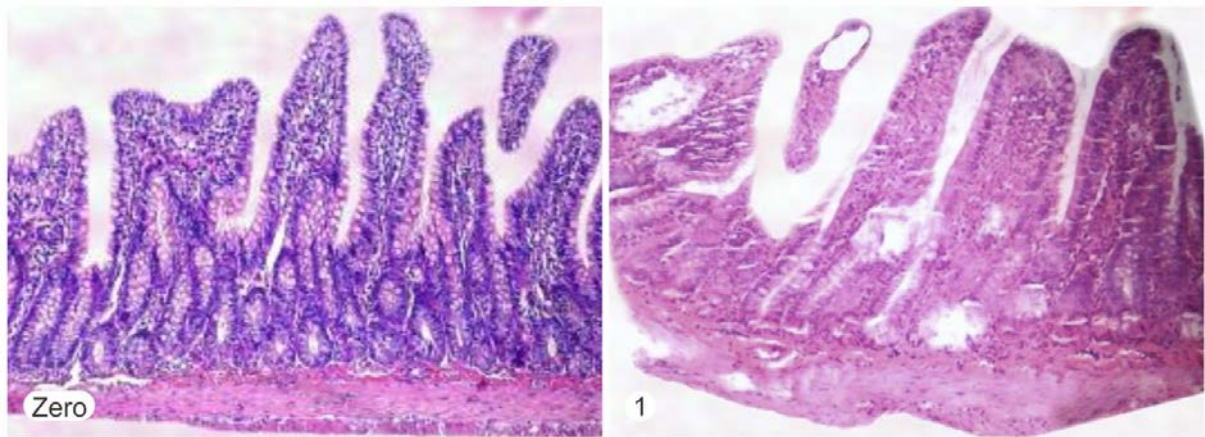


Figura 10 - Fotomicrografias (100x) representativas demonstrando as lesões da mucosa intestinal de ratos submetidos à isquemia e reperfusão zero e 1 de Chiu dos ratos 1 e 4 do grupo Sham, respectivamente.

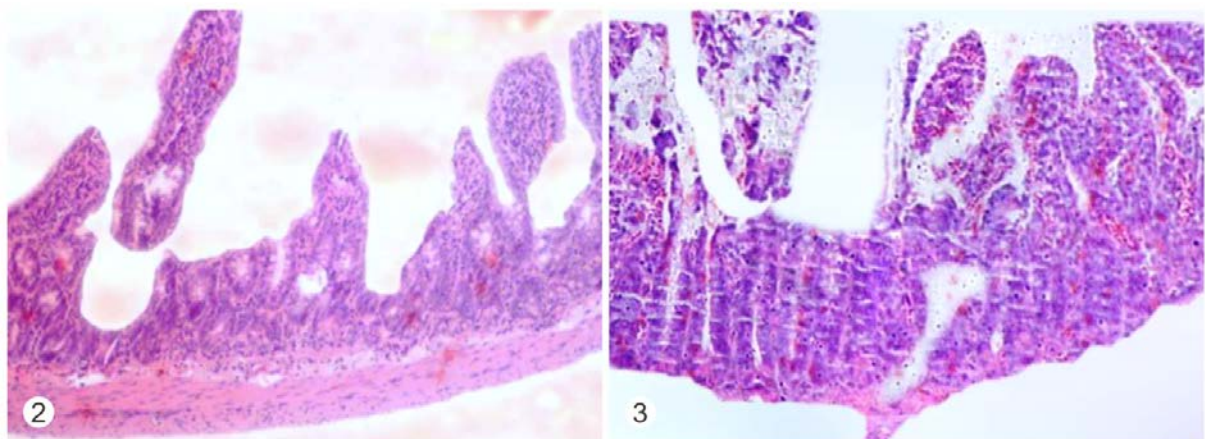


Figura 11 - Fotomicrografias (100x) representativas demonstrando as lesões da mucosa intestinal de ratos submetidos à isquemia e reperfusão 2 e 3 de Chiu dos ratos 7 e 8 dos grupos PTX e PGE1, respectivamente.

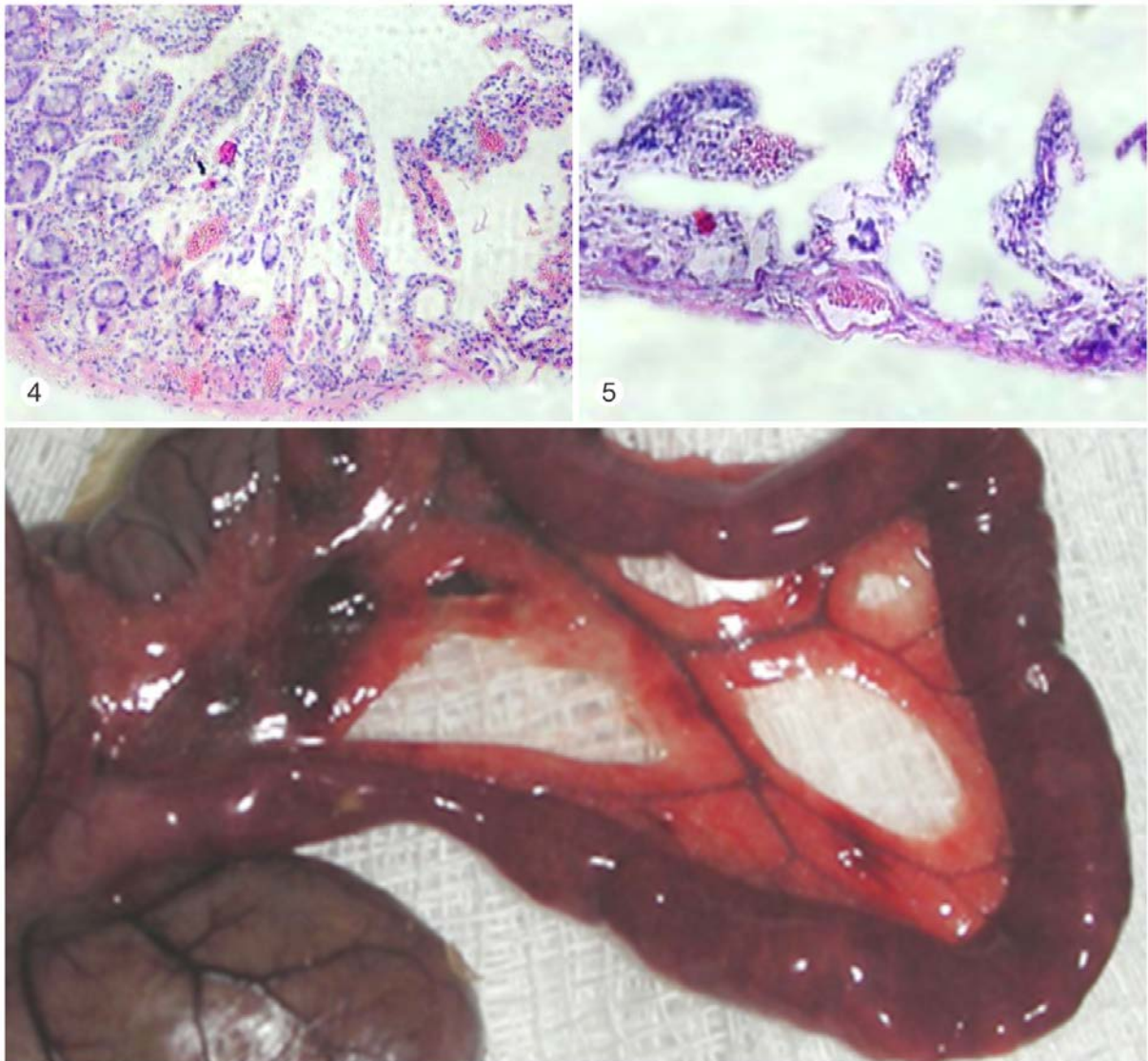


Figura 12 - Fotografia macroscópica do íleo terminal com isquemia grave antes da reperfusão e fotomicrografias (100x) demonstrando as lesões da mucosa intestinal dos ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal grau 4 e 5 de Chiu dos ratos 5 e 8 do grupo A (controle).

5.2 Resultados da análise imunohistoquímica

Tabela 2 - Análise estatística intergrupo das criptas na avaliação imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	ANOVA Intergrupos	Tukey	Valor p
Cripta a	70.1±22.4	16.8±3.2	11.7±1.8	2.4±0.5	<0,0001	Grupo A vs Grupo B	<0,01
Cripta b	80.8±13.6	16.0±2.7	11.0±1.6	2.2±1.6		Grupo A vs Grupo C	<0,01
Cripta c	79.7±19.8	16.7±3.1	11.6±1.8	2.4±0.5		Grupo A vs Grupo D	<0,01
						Grupo B vs Grupo C	<0,05
Cripta d	84.8±9.1	17.3±2.3	10.8±1.9	2.8±0.8		Grupo B vs Grupo D	<0,01
						Grupo C vs Grupo D	<0,01
Média final	78,9±17,3	16,7±2,8	11,3±1,8	2,5±0,9			
ANOVA Intragrupo	0,2781	0,7876	0,6249	0,8247			
	Ns	ns	ns	ns			

Tabela 3 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, e analisadas no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas nas criptas analisadas com a média final do **Grupo A**.

Grupo A	Cripta Aa	Cripta Ab	Cripta Ac	Cripta Ad
1	54	95	97	84
2	48	72	47	79
3	74	72	69	73
4	45	56	49	69
5	46	84	102	95
6	96	77	78	87
7	92	95	87	93
8	107	102	103	97
9	74	77	83	86
10	65	78	82	85
Total	701	788	748	848
Médias	70,10	78,80	74,80	84,80
Média final	77,12			

Testada a hipótese de diferença na análise imunohistoquímica para as criptas do grupo controle (Grupo A) Os subgrupos das quatro criptas foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

Tabela 4 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, e analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em criptas analisadas com a média final do **Grupo B**.

Grupo B	Cripta Ba	Cripta Bb	Cripta Bc	Cripta Bd
1	22	21	23	19
2	21	18	19	16
3	19	17	19	20
4	18	17	14	19
5	13	12	15	18
6	17	15	14	18
7	15	13	14	13
8	16	17	18	14
9	13	17	14	18
10	14	13	17	18
Médias	14,60	13,90	12,50	14,90
Média final	13,97			

Testada a hipótese de diferença na análise imunohistoquímica para as criptas do grupo PTX (Grupo B) Os subgrupos das quatro criptas foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

Tabela 5 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido um campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, e analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante), calculando as médias em cada subgrupo das criptas analisadas com a média final do **Grupo C**.

Grupo C	Cripta Ca	Cripta Cb	Cripta Cc	Cripta Cd
1	9	10	11	9
2	13	12	11	10
3	13	12	13	9
4	10	11	13	11
5	14	9	12	13
6	11	13	12	9
7	12	13	9	11
8	13	11	9	14
9	13	11	11	9
10	9	8	15	13
Médias	11,70	11,00	10,50	10,80
Média final	11,00			

Testada a hipótese de diferença na análise imunohistoquímica para as criptas do grupo PGE1 (Grupo C) Os subgrupos das quatro criptas foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$.

Tabela 6 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido um campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, no campo analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante), calculando as médias em cada subgrupo das criptas analisadas com a média final do **Grupo D ou Sham**.

Grupo D	Cripta Da	Cripta Db	Cripta Dc	Cripta Dd
Rato 1	2	1	3	2
Rato 2	3	4	2	3
Rato 3	2	3	2	4
Rato 4	2	3	3	2
Rato 5	3	0	2	3
Médias	2,40	2,20	2,40	2,80
Média final	2,50			

Testada a hipótese de diferença na análise imunohistoquímica para as criptas do grupo Sham (Grupo D) Os subgrupos das quatro criptas foram comparados pela análise da variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de decisão foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

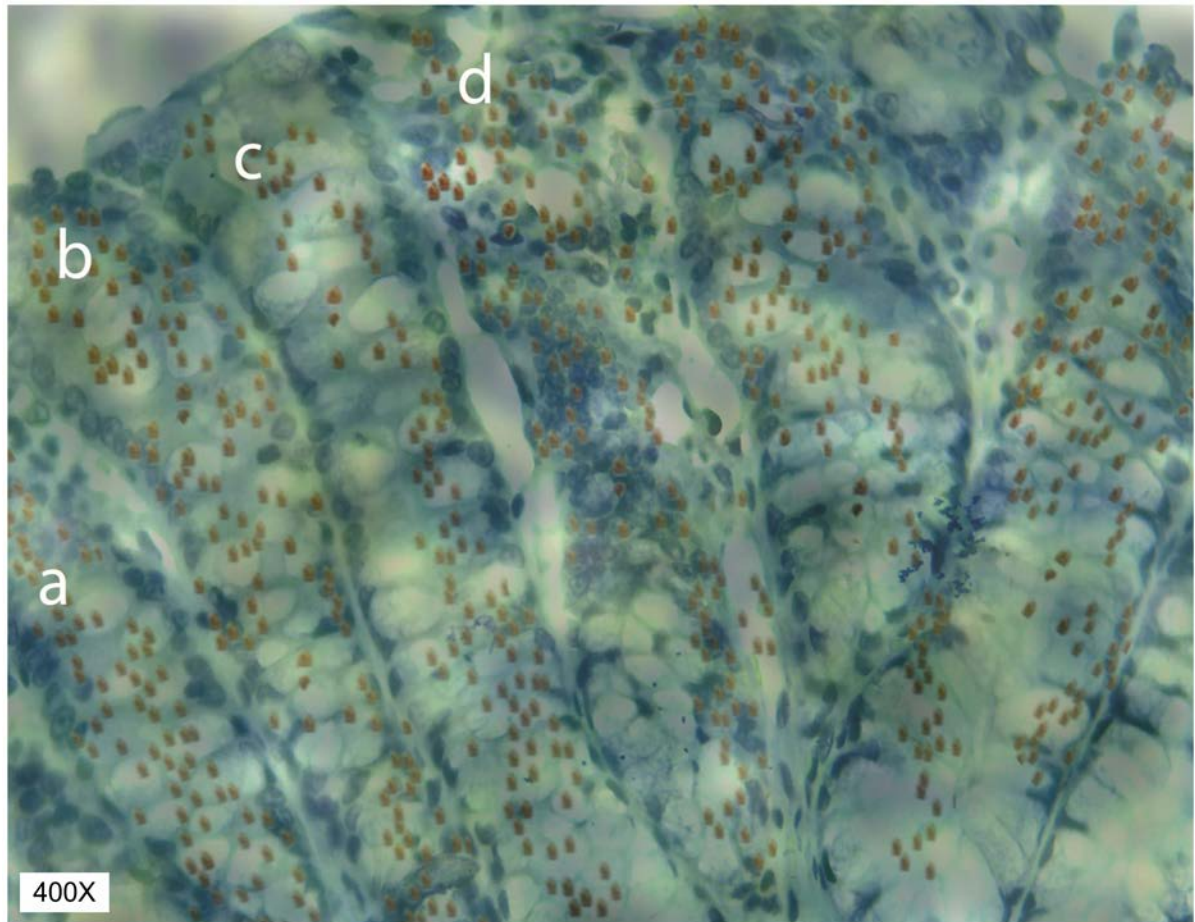


Figura 13 - Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 10A**. Imagem capturada pelo microscópio LEICA, modelo DM 500, com dupla cabeça, acoplado com câmera digital LEICA ICC 50 HD, com LAS Software Version 4.0.0, 2011, com conexão ao *notebook* Dell XPS/M13 GHz, 3582 MB RAM e sistema operacional Microsoft Windows Vista® Ultimate. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, no campo analisado no microscópio conforme configuração acima. Em seguida, realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo A**.

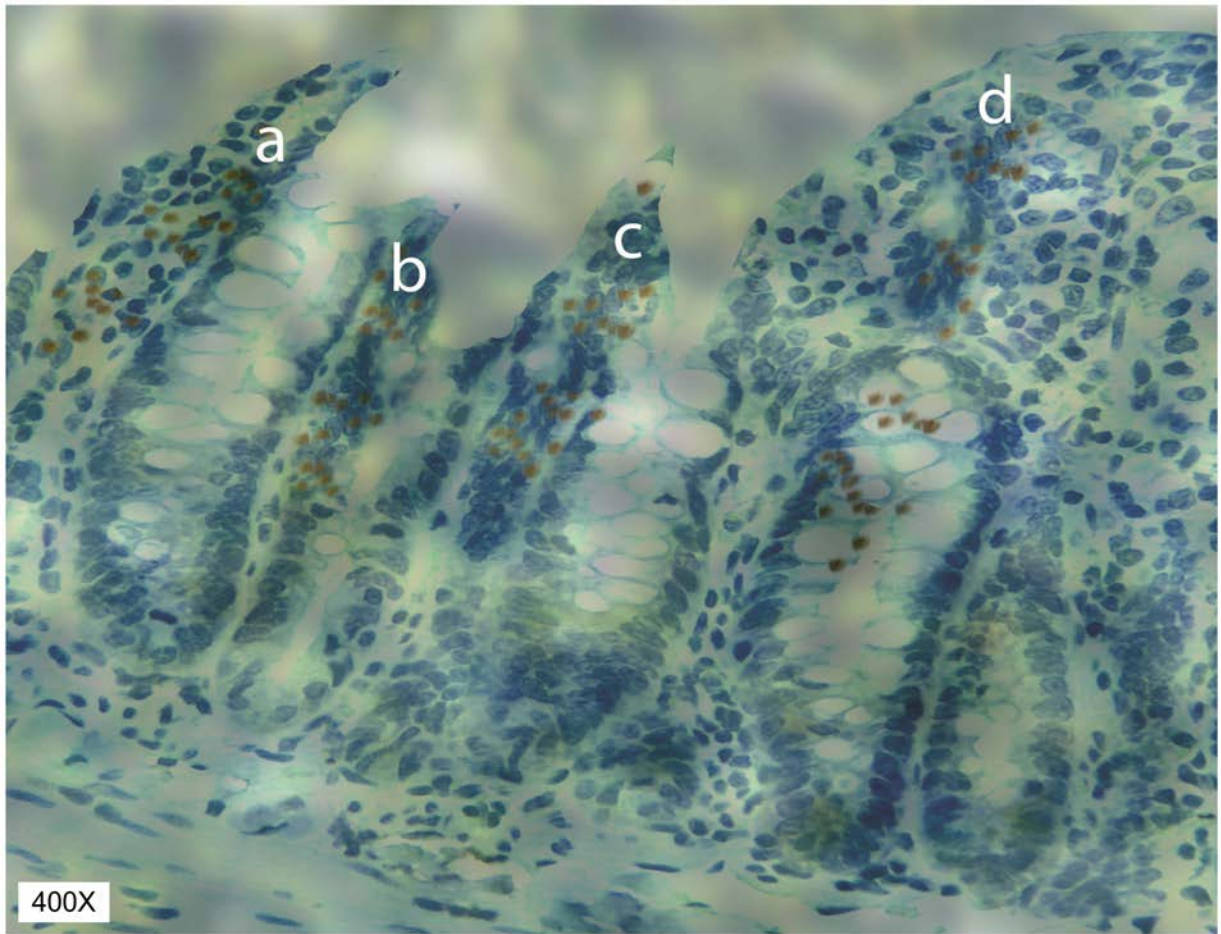


Figura 14 -Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 1B**. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita. Realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo B**.

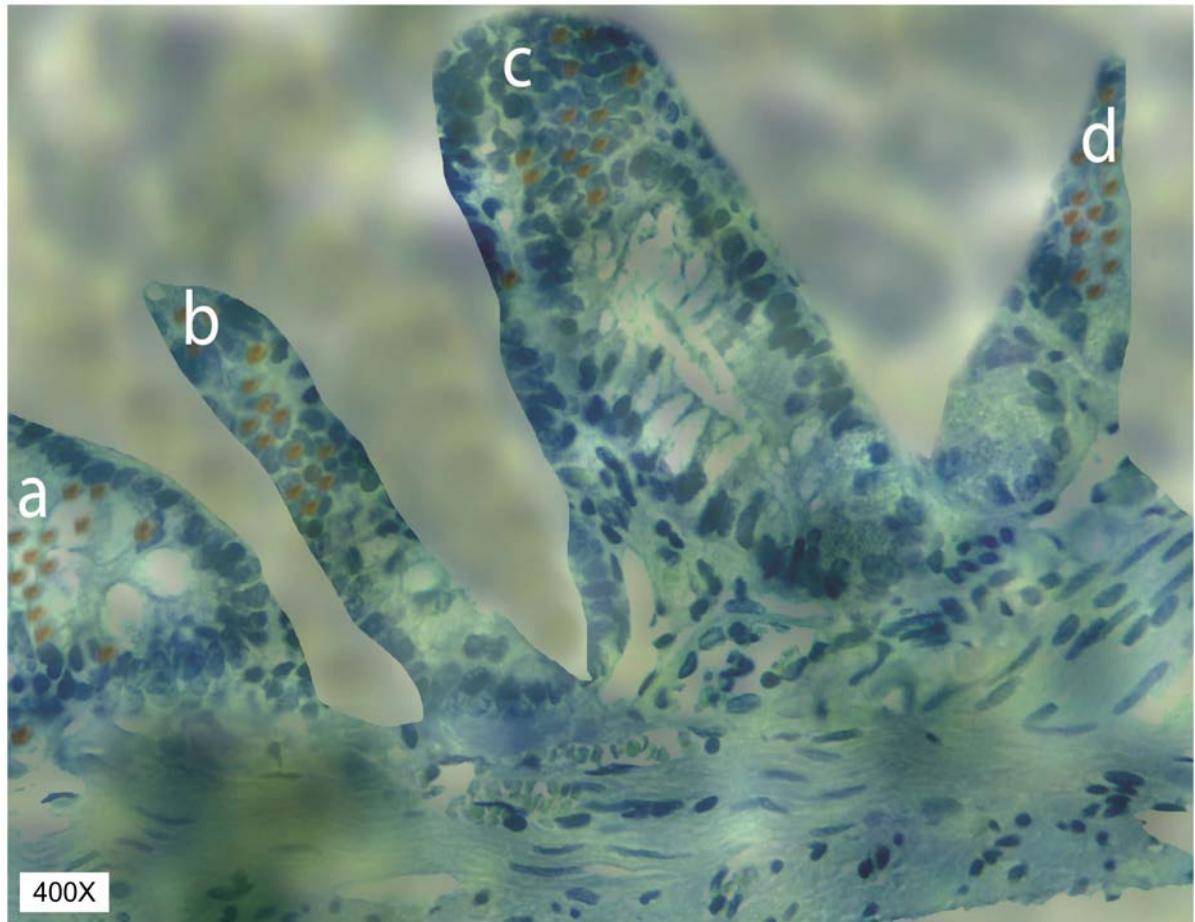


Figura 15 - Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 1C**. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita. Realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo C**.

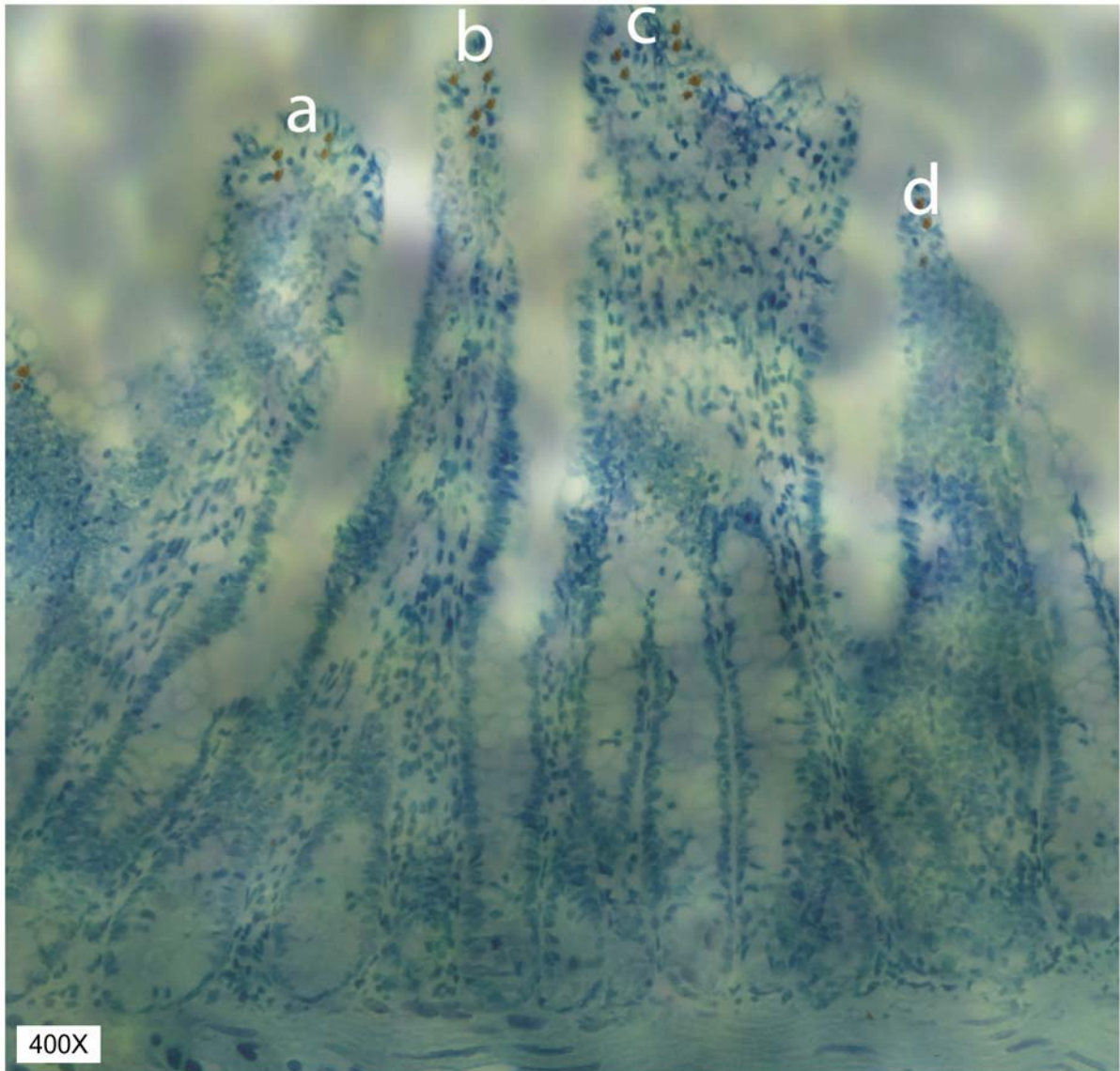


Figura 16 - Fotomicrografia representativa da análise imunohistoquímica **Rato 1D**. Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a b c e d**, da esquerda para direita. Realizada a contagem visual das células coloridas em **marrom** (expressão do anti-FAS ligante) do **Grupo D**.

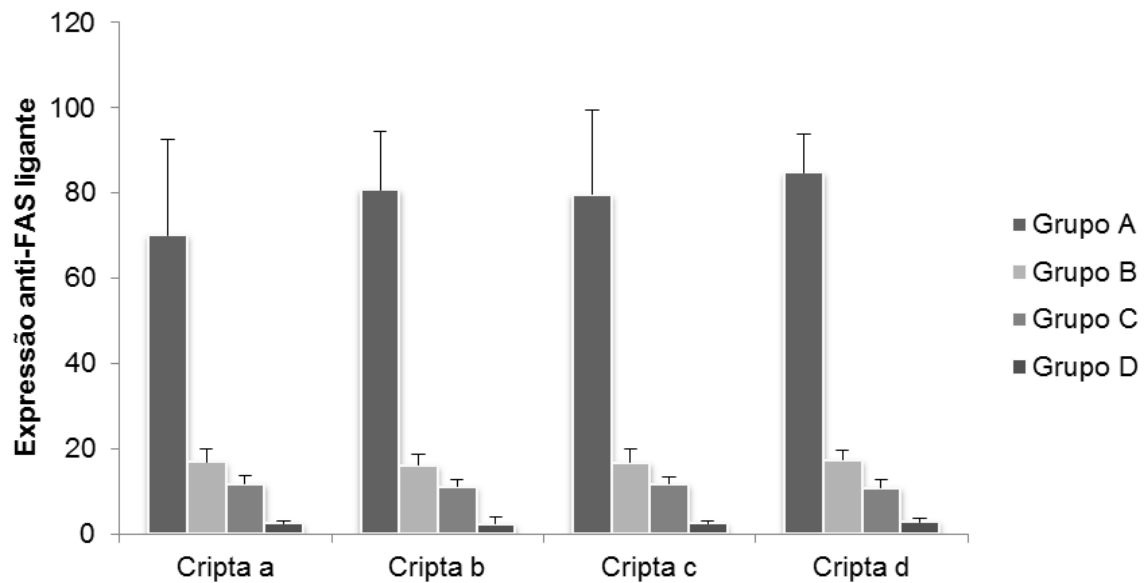


Gráfico 3 - Avaliação comparativa da diferença entre as médias das criptas entre os grupos. Contagem das **células coloridas em marrom** (expressão do anti-FAS ligante). **Distribuição de valores por cripta.** Valores expressos em médias e desvios-padrão.

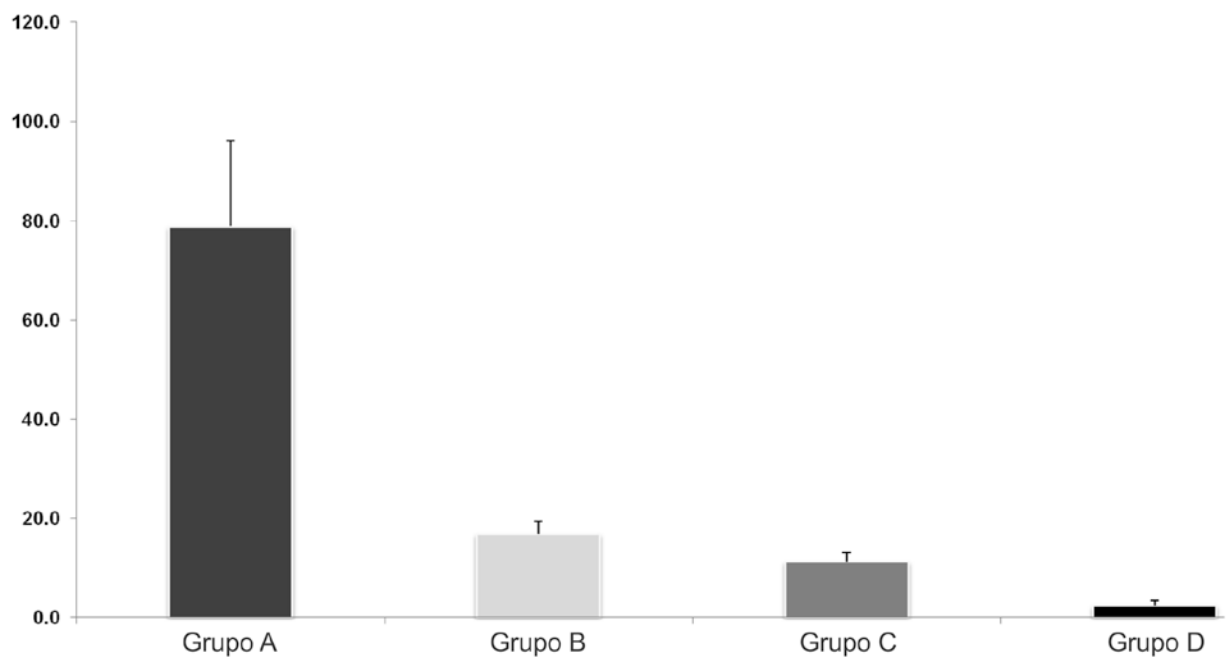


Gráfico 4 - Avaliação da Imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Contagem das **células coloridas em marrom** (expressão do anti-FAS ligante). Distribuição de valores por grupo (média final). Valores expressos em médias e desvios-padrão.

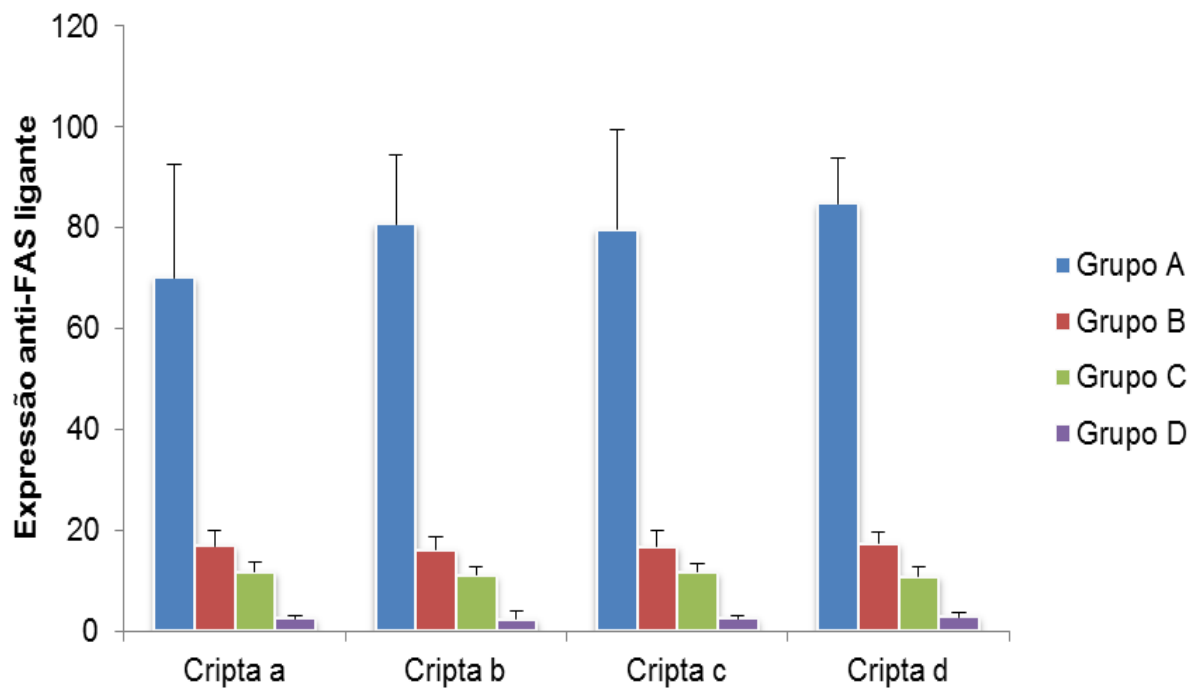


Gráfico 5 - - Avaliação comparativa da diferença entre as médias das criptas entre os grupos. Contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante). Distribuição de valores por cripta. Valores expressos em médias e desvios-padrão.

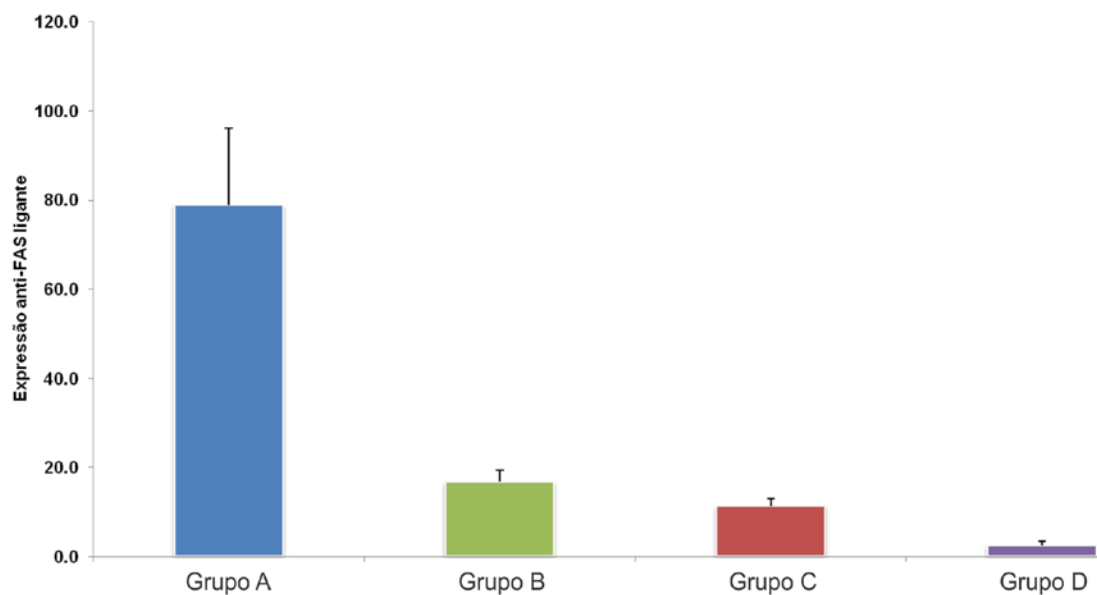


Gráfico 6 - Demonstração em cor da distribuição de valores das médias nas criptas por grupo (média final). Valores expressos em médias e desvios-padrão.

6 DISCUSSÃO

O intestino delgado está frequentemente sujeito a quadros relevantes de isquemia arterial aguda. A extensão e gravidade das alterações morfológicas e funcionais teciduais dependem fundamentalmente do período de oclusão do fluxo sanguíneo arterial (HENGARTNER, 2000; LOCKSHIN, ZACHERI, 2002), sendo que em algumas situações a única opção terapêutica é a ressecção intestinal como tentativa de salvar a vida do paciente e, mesmo assim, com uma grande maioria evoluindo para o óbito.

Diante de um quadro isquêmico do intestino delgado, a prioridade é restabelecer o fluxo sanguíneo que pode piorar as lesões já presentes no período da isquemia. Trabalhos de experimentação com animais têm procurado estudar modelos que possam reproduzir as condições de isquemia encontradas nos seres humanos e com isso ter um melhor entendimento da fisiopatologia do processo de isquemia e reperfusão e tentar criar alternativas terapêuticas (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000, SANTOS et al., 2006). Optou-se pelo modelo de obstrução isolada da artéria mesentérica superior por atender aos nossos objetivos, ou seja, de tentar simular a ocorrência de isquemia arterial aguda intestinal que ocorrem com frequência na prática clínica.

O rato (Figura 5) é um animal de uso corrente em modelos de isquemia e reperfusão tecidual (I/R), inclusive intestinal. É frequentemente usado em modelos experimentais, tendo em vista sua fácil obtenção, manipulação e o seu baixo custo (FAGUNDES, TAHA, 2004). A facilidade de manutenção desses animais em ambiente controlado facilitou a elaboração de uma amostra homogênea de ratos machos, com idade e peso similares na realização da presente pesquisa. Utilizaram-se os procedimentos anestésicos padronizados pelo Programa de Pós-Graduação da UFMS em modelo animal de doenças em experimentos envolvendo ratos. O uso intraperitoneal da associação de quetamina e xilazina foi suficiente para manter os animais em plano anestésico durante todos os procedimentos operatórios. Nos intervalos de observação a analgesia proporcionada pela nalbufina foi adequada, pois os animais se locomoveram espontaneamente na gaiola e procuram a água e alimento disponíveis.

Os testes do projeto piloto mostraram que 60 minutos de isquemia seguidos do mesmo tempo de reperfusão provocaram lesões histológicas acentuadas, tipo grande infiltrado inflamatório e necrose celular com destruição da mucosa intestinal, servindo de parâmetro confiável para comprovar as lesões de isquemia e reperfusão intestinal.

A análise dos resultados histológicos da presente pesquisa foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por Chiu et al. (1970) , método consagrado na literatura para avaliação das alterações teciduais da mucosa de intestino delgado de rato resultantes do fenômeno de isquemia reperfusão. A avaliação histológica por critério de Chiu (Figura 9) demonstrou que no grupo controle as lesões da mucosa intestinal foram muito mais graves predominando os graus 4 e 5 (Figura 12), enquanto que nos grupos que utilizou-se separadamente os fármacos PTX e PGE1 as lesões histológicas foram mais favoráveis, atenuando as lesões da mucosa intestinal, predominando os graus 2 e 3 (Figura11), com menos infiltrados inflamatórios e menos necrose, mantendo-se as criptas mais organizadas e a integridade da submucosa, evidenciando as propriedades protetoras destes medicamentos que tiveram provável atuação favorável bloqueando os agentes mediadores da resposta fisiopatológica agressiva da isquemia e reperfusão por apresentarem várias propriedades protetoras destas substâncias contra estas lesões no intestino delgado de ratos. No grupo Sham predominou o tecido epitelial normal, apenas dois animais apresentaram-se normal e lesão grau 1 (Figura 10), considerada lesão discreta por provável renovação epitelial fisiológica.

Os resultados de proteção dos fármacos utilizados na presente pesquisa superam os efeitos protetores de várias outras substâncias já testadas na literatura, que funcionam apenas como supostos efeitos protetores antioxidantes e apresentam resultados duvidosos e controversos na literatura, tais como Vitamina E, Vitamina C, quelantes de ferro, superóxido dismutase, oxigenação hiperbárica, manitol, N-acetilcisteína, pré e pós-condicionamento isquêmico, substâncias alcalinas, entre outras. São poucos factíveis de utilização na prática clínica em função da presença de efeitos protetores isolados, que são insuficientes para oferecer uma proteção confiável num processo fisiopatológico tão complexo como da isquemia e reperfusão tecidual (BERTOLETTO et al., 2008; BERTOLETTO et al., 2012; MÜHLBACHER, LANGER, MITTERMAYER, 2009; WU et al., 2002; LI et al., 2005; LIN et al., 2005;

FREIBERGER et al., 2004; NYDEGGER et al., 2002; ISSELHARD, MINOR, 2009; SANTOS et al., 2010).

A busca de uma droga que possa atuar reduzindo a liberação das espécies reativas de oxigênio, além de limitar a resposta inflamatória mediada por neutrófilos e a liberação do fator de necrose tumoral, bem como todos os mediadores da complexa resposta inflamatória neste fenômeno, constitui uma opção válida para o controle das lesões de isquemia e reperfusão no intestino delgado após isquemia arterial aguda ou transplante intestinal. De acordo com os resultados histológicos em lâminas coradas em HE e pelo estudo estatístico dos escores obtidos com base nos critérios de Chiu et al. (1970), observou-se que a pentoxifilina e da prostaglandina E1 usadas separadamente em grupos diferentes favoreceu com atenuação das lesões da mucosa intestinal provocadas pelo processo da isquemia e reperfusão tecidual, que indicam alterações histológicas teciduais menos graves. Tais resultados em comparação com o controle mostraram um efeito benéfico das duas drogas utilizadas separadamente na isquemia reperfusão intestinal em grupos diferentes, corroborando os dados encontrados na literatura que evidenciaram várias propriedades contra as lesões teciduais de intestino delgado, utilizando estes fármacos em outros tecidos ou mesmo no intestino embora em tempos de isquemia diferentes, necessitando de uma padronização em relação ao tempo de isquemia e reperfusão para cada órgão avaliado, objetivando garantir com segurança o verdadeiro efeito protetor destas substâncias apresentados por vários autores (BRASILEIRO et al., 2007; TERUYA et al., 2008; ELLIOT et al., 1995; TETI et al., 1999; SAVIC et al., 2002; BRASILEIRO, 2006; TERUYA, 2006; MARQUIL et al., 2011; CÁMARA-LEMARROY et al., 2010; TOPCU et al., 2007; HOSSAIN et al., 2006; GAO, HORIE, 2002; KAWAMURA et al., 2004; MOESER et al., 2006; AWDA et al., 1996; MEHRABI et al., 2001; MORESCHI, 2006; MORESCHI et al., 2007; SPARKES et al., 2010; SHIN et al., 2012).

Na análise imunohistoquímica desta pesquisa, aconteceu uma expressão positiva do anti-FAS ligante, demonstrando ser um marcador eficiente e factível para identificar apoptose celular que predominou no grupo controle com bastante expressão do mesmo confirmando o que já havia sido demonstrado por estes autores (ASSIS, 2012; ASSIS et al., 2013; MARKS, 2007; KANOMATA, 2011; JING et al., 2010). Esses dados evidenciaram que neste grupo (Figura 13), no qual não se

utilizou nenhuma substância protetora no processo de isquemia e reperfusão, muitas células epiteliais morreram pelo mecanismo da apoptose.

Em contrapartida, nos grupos que se utilizou a PTX e PGE1 (Figuras 14 e 15) separadamente ocorreu uma menor expressão do FAS ligante e certamente promoveram renovação epitelial, demonstrando, mais uma vez, os efeitos favoráveis destes fármacos contra morte celular por apoptose no fenômeno isquemia e reperfusão sinalizando positivamente seus efeitos protetores. Estes resultados corroboraram os obtidos na literatura já comentada sobre as propriedades protetoras destas substâncias, reforçando e confirmando, cada vez mais, que a PTX e PGE1 têm um futuro promissor com resultados favoráveis atenuando o fenômeno da isquemia e reperfusão em intestino delgado de ratos.

Esta observação pontua a necessidade de uma padronização nas futuras pesquisas com animais para que possamos investir nestes medicamentos na proteção e, quem sabe, possibilitar a transferência deste arsenal terapêutico para o tratamento em ser humano, principalmente no que diz respeito à isquemia intestinal aguda que é considerada uma doença extremamente dramática, ainda com altos índices de mortalidade, por conta do difícil diagnóstico precoce e pelo tratamento cirúrgico oferecer pouco resultado positivo.

No grupo Sham (Figura 16) identificou pouca expressão do anti- FAS ligante sinalizando uma possível renovação epitelial fisiológica, pois acontece com maior frequência no topo das vilosidades epiteliais, conforme literatura já comentada (JING et al., 2008; BUSSUAN et al., 2010; KANOMATA, 2011; ASSIS, 2012; ASSIS et al., 2013; MARKS, 2007).

A prostaglandina E1 apresentou resultados mais favorável que a Pentoxifilina tanto na avaliação histológica quanto na imunohistoquímica, embora do ponto de vista estatístico não houvesse diferença nenhuma. Isso pode ser em decorrência de algumas propriedades a mais da PGE1 tipo fibrinólise, anfigênese, além de um potente vasodilatador que parece favorecer a atenuação das lesões fisiopatológicas provocadas pelo processo de isquemia e reperfusão tecidual.

7 CONCLUSÕES

1. A pentoxifilina e a prostaglandina E1 mostraram-se favoráveis na atenuação das lesões teciduais na mucosa de intestino delgado de ratos no processo de isquemia e reperfusão;
2. A classificação pelos critérios de Chiu foi eficiente para mostrar as lesões histológicas na mucosa de intestino delgado de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão tecidual;
3. O marcador anti-FAS ligante foi efetivo para identificar a morte celular por apoptose no processamento imunohistoquímico de intestino delgado de ratos.

8 REFERÊNCIAS

Arena EA, Longo WE, Roberts KE, Geibel P, Nateqi J, Brandstetter M, Geibel JP. Functional role of NHE4 as a pH regulator in rat and human colonic crypts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302(2): 412-18.

Alves WF, Guimarães SB, Vasconcelos PRC, Vasconcelos PRL. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos à revascularização distal. *Acta Cir Bras*. 2003;18(3):209-15.

Assis P V. Expressão de Fas ligante nos testículos ipsilateral e contralateral de ratos submetidos à torção do cordão testicular unilateral. [Tese-Mestrado], Campo Grande (MS): Faculdade de Medicina-Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2012.

Assis PV, Aydos RD, Silva IS, Marks G, Takita LC, Gonçalves MA, Ramalho RT. Expression of FAS ligand in the ipsilateral and contralateral testicles of rats subjected to the torsion of the unilateral testicular cord. *Acta Cir Bras*. 2013; 28(7): 518-22.

Bozkurt AK. Alpha-tocopherol(Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg*. 2002;43:693-6.

Bertoletto PR, Chaves JC, Fagundes ATN, Simões RS, Oshima CTF, Simões MJ, Fagundes DJ. Effect of different periods of hyperbaric oxygen on ischemia-reperfusion injury of rat small bowel. *Acta Cir Bras*. 2008; 23(1): 23-6.

Bertoletto PR, Ikejiri AT, Somaio Neto F, Chaves JC, Teruya R, Bertoletto ER, Taha MO, Fagundes DJ. Oxidative stress gene expression profile in inbred mouse after ischemia/reperfusion small bowel injury. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(11): 773-81.

Bertoletto, PR. Estudo morfológico do intestino delgado de ratos na isquemia-reperfusão sob oxigenação hiperbárica [Tese - Mestrado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo; 2005.

Brahmbhatt V, Oliveira M, Briand M, Perrisseau G, Schmid VB, Destailats F, Asciak CA, Benyacoub J, Bosco N. Protective effects of dietary EPA and DHA on ischemia-reperfusion-induced intestinal stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24(1): 104-11.

Brasileiro JL, Fagundes DJ, Miji LON, Oshima CTF, Teruya R, Marks G, Inouye CM, Santos MA. Ischemia and reperfusion of the soleus muscle of rats with pentoxifylline. *J Vasc Bras*. 2007; 6(1): 50-63.

Brasileiro JL. Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos submetidos à isquemia-reperfusão sob ação da pentoxifilina [Tese - Mestrado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Bulbuloglu E, Yildiz H, Senoglu N, Coskuner I, Yuzbasioglu MF, Kilinc M, Dogan Z, Deniz C, Oksuz H, Kantarçeken B, Atli Y. Protective effects of zinc, pentoxifylline, and N-acetylcysteine in an animal model of laparoscopy-induced ischemia/reperfusion injury of the small intestine. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2011; 21(10): 947-51.

Bussuan LAM, Fagundes DJ, Marks G, Bussuan PM, Teruya R. O papel da proteína ligante Fas no estresse oxidativo induzido pelo azoximetano em criptas do colo de ratos. *Acta Cir Bras*. 2010; 25(6): 501-06.

Byrka-Owczarek K, Steplewska-Mazur K, Krason M, Bohosiewicz J, Koszutski T, Wojtynek G. The Evaluation of the Protective Action of Antioxidants on Small Intestine of Rabbits Experimentally Injured by Ischemia and Reperfusion. *J Pediatr Surg*. 2004; 39: 1226-29.

Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de La Garza FJ, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Muñoz-Espinosa LE, Fernández-Garza NE. Effects of thalidomide and pentoxifylline over local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion. *Transplant Proc*. 2010; 42(5): 1624-6.

Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida W B, Padovani CR. Alterações sistêmicas na isquemia e reperfusão de órgãos esplâncnicos em ratos. *Acta Cir Bras.* 2009; 24(4): 290-95

Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. *Arch Surg.* 1970; 101: 478-83.

Coopersmith CM, Donnell DO, Gordon JI. Bcl-2 inhibits ischemia-reperfusion-induced apoptosis in the intestinal epithelium of transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1999;(276):677-86.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Lesão e morte celular: lesão de isquemia e reperfusão. In: Robbins. *Patologia estrutural e funcional.* 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. p.1-26.

Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Laura D, Sarro A, Loo V, Fons AJ, Achille C, Christoph T. Inflammatory response after potischemic injury. *Shock.* 2002; 18(2): 169-76.

Da Silva MG. Estudo histológico e bioquímico sérico do alfa-tocoferol na lesão de isquemia e reperfusão em membros pélvicos de ratos [Tese Mestrado]. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2004.

Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 2002; 102(12): 4489-500.

Elliot JW. The operative relief of gangrene of the intestine due to occlusion of the mesenteric vessels. *Ann Surg.* 1995; 21: 9-23.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):59-65.

Francisco Neto A, Silva JCCB, Fagundes DJ, Percário S, Novos F, Juliano Y, Moreira Neto AA. Estudo das alterações oxidativas da capacidade antioxidante total

do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão dos membros posteriores. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(2): 134-9.

Freiberger J, Coulombe K, Suliman H, Carraway M, Piantadosi C. Superoxide dismutase responds to hyperoxia in rat hippocampus. *Undersea Hyper Med.* 2004;31(2):227-32.

Gao F, Horie T. A synthetic analog of prostaglandin E1 prevents the production of reactive oxygen species in the intestinal mucosa of methotrexate-treated rats. *Life Sciences.* 2002; 71: 1091-99.

Gomes OM, Brasileiro Filho G, Salles RLA, Linhares RE, Nazar MC, Porto LAB, Paixão RM, Miranda MH. Ischemia-reperfusion histopathology alterations of the rabbit intestinal wall with and without ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras.* 2011; 26(4): 285-88.

Guan YF, Pritts TA, Montrose MH. Ischemic post-conditioning to counteract intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2010; 15(4): 137-43.

Harada K, Ozaki S, Gershwin ME, Nakanuma Y. Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1997; 26: 1399-05.

Hengartner, MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.

Hossain MA, Wakabayashi Z, Izuishi H, Okano K, Yachid S, Maeraz H. The Role Of Prostaglandins in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Current Pharmaceutical Design.* 2006; 12: 2935-51.

Jing Lu J, Caplan MS, Li D, Jillin G. Platelet-activating factor-induced apoptosis is blocked by Bcl-2 in rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008; 294:(5) 1181-90.

João SA, Alencar SSS, Medeiros AC, Diniz SOF, Cardoso VN, Brandt CT. Translocation of ^{99m}Tc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2004; 19(4): 328-33.

Kanomata F. Estudo quantitativo na expressão de Fas ligante pós-indução de estresse oxidativo em mucosa gástrica com administração de azoximetano, em ratos. [Tese-Mestrado], Campo Grande (MS): Faculdade de Medicina-Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.

Kaplowitz N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *Clin Liver Dis*. 2000;4:1-23.

Kawamura T, Nara N, Kadosaki M, Inada K, Endo S. Prostaglandin E1 reduces myocardial reperfusion injury by inhibiting proinflammatory cytokines production during cardiac surgery. *Crit Care Med*. 2004; 28(7): 2201-208.

Khanna A, Rossman JE, Fung HL, Caty MG. Intestinal and emodynamic Impairment Following Mesenteric Ischemia/Reperfusion. *J Surg Res*. 2001; 99: 114-119.

Kim H, Rhee SH, Pothoulakis C, Lamont JT. Inflammation and apoptosis in clostridium difficile enteritis is mediated by pge2 up-regulation of fas ligand. *Gastroenterology*. 2007; (133): 875-86.

Kimura, M, Kataoka M, Kuwabara Y, Sato A, Sugiura M, Fujii Y. Real-time energy metabolism of intestine during arterial versus venous occlusion in the rat. *J Gastroenterol*. 2003; 38: 849–53.

Langer JC, Sohal SS, Blennerhassett P. Mucosal permeability after subclinical intestinal ischemia-reperfusion injury: an exploration of possible mechanisms. *J Pediatr Surg*. 1995; 30(4) 568-72.

Langer JC, Sohal SS, Riddell RH. Mucosal permeability to ^{51}Cr EDTA following subclinical intestinal ischemia-reperfusion injury in the weanling rat. *J Pediatr Surg*. 1993; 2: 601-05.

Leng YF, Zhang Y, Xue X, Wang T, Kang YQ. Ischemic post-conditioning attenuates the intestinal injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(5): 411-17.

Li Y, Zhou C, Calvert JW, Colohan AR, Zhang JH. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol.* 2005;191(1):198-200.

Lin HC, Wan FJ, Wu CC, Tung CS, Wu TH. Hyperbaric oxygen protects against lipopolysaccharide-stimulated oxidative stress and mortality in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005;508(1-3): 249-54.

Lockshin RA, Zacheri Z. Caspase-independent cell death. *Curr Op Cell Biol.* 2002;14:727-33.

Loganathan A, Linley JE, Rajput I, Hunter M, Lodge JPA, Sandle GI. induced by chemical hypoxia Basolateral potassium (IKCa) channel inhibition prevents increased colonic permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300(1): 146-53.

Marks G. Carcinogênese induzida em colo de ratos e os efeitos da modulação do inositol hexafosfato sobre as vias de sinalização celular da apoptose. [Tese-Doutorado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo; 2007.

Marqui CE, Silval HCA, Ferez D, Cavassanil SS, Moraes JB, Silva DAM, Simões RS, Lopes CA, Taha MO, Oliveira-Júnior IS. Pretreatment with pentoxifylline attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011; 26(6): 438-44.

Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Stanek B, Thalhammer T, Forouzan T, Amaddon F, Pacher R, Steiner GE, Wild T, Grimm M, Paul G, Spieckermann P G, Mall G, Helmut D Glogar H D. Angiogenesis stimulation in explanted hearts from patients pre-treated with intravenous prostaglandin E. *J Heart Lung Transplantation.* 2001; 20(4): 465-73.

Moeser AJ, Nighot PK, Ryan KA, Wooten JG, Blikslager AT. Prostaglandin-mediated inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 stimulates recovery of barrier function in ischemia-injured intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 291: 885-94.

Moreschi Júnior D, Fagundes DJ, Amado LEB, Bersani LE, Hernandez L, Moreschi HK. Efeitos da prostaglandina E1 (PGE1) na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos: estudo histológico. *J Vasc Bras*. 2007; 6(4): 316-24.

Moreschi Junior D. Efeitos da Prostaglandina E1 na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos: estudo histológico e ultraestrutural [Tese - Doutorado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc*. 2009;31:2069-70.

Massberg S, Messner K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1998;30:4217-23.

Pan JF. Effect of qihuang decoction on mRNA expressions of Bcl-2, Bax, and Caspase-3, 9 in intestinal mucosa epithelium of ischemia/reperfusion injured rats. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. 2011; 31(2): 223-27

Parolin MB, Reason IJM. apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq. Gastroenterol*. 2001; 38(2): 138-44.

Parks DA, Groggaard B, Granger DN. Comparison of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. *Surgery*. 1982;92:896-901.

Pawlik MW, Obuchowicz R, Biernat J, Szczepanski W, Pajdo R, Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. Effects of peripherally and centrally applied

ghrelin in the pathogenesis of ischemia-reperfusion induced injury of the small intestine. *J Physiol Pharmacol.* 2011; 62(4): 429-39.

Peres EC. Estudo da reatividade vascular em ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal: mecanismos envolvidos e papel protetor da sinvastatina. [Tese-Mestrado], São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2012.

Piccinato CE, De Domenico Jr A, Jordão Jr AA, Vannucchi H. Skeletal muscle ischemia and reperfusion in rats increase lipid peroxidation in rats. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(5):578-81.

Pitta GBB, Roque FP, Pitta MR. O sexteto mágico da pesquisa clínica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009; 24(2): 113-15.

Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCDV, Gomes OM, Mijji LON, Bispo MAF. Tratamento da Isquemia Mesentérica pelo Pós-Condicionamento Isquêmico. *Rev bras Coloproct.* 2008; 28(2): 187-92.

Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCVD, Mijji LON, Bispo MAF. Efeito do pré e pós-condicionamento isquêmico sobre a mucosa intestinal de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão mesentérica. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(1): 22-8.

Santos CHM, Pontes JCDV, Gomes OM, Mijji LON, Bispo MAF. Evaluation of ischemic postconditioning effect on mesenteric ischemia treatment. experimental study in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009; 24(2): 150-56.

Santos CHM, Pontes JCDV, Gomes OM. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. *Rev Bras Coloproctol.* 2006; 26(1): 28-33.

Santos CHM, Pontes, JCDV, Mijji LON, Nakamura DI, Galhardo CAV, Agüena, SM. Postconditioning effect in the hepatic ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2010; 25(2): 63-68.

Santos MO, Lopes MF, Catré D, Gonçalves E, Cabrita A. Efeito de hidroxietilamido sobre lesão renal aguda em modelo de isquemia-reperfusão hepática. *Acta Med Port.* 2012; 25(5): 308-16.

Savic V, Vlahovic P, Djordjevic V, Mitic-Zlatkovic M, Avramovic V, Stefanovic V. Nephroprotective effects of pentoxifylline in experimental myoglobinuric acute renal failure. *Pathol Biol.* 2002; 50: 599-607.

Serpa BS, Tachibana A, Baroni RH. Acute and Chronic mesenteric ischemia: MDCT findings. *J Vasc Bras.* 2010; 9(3): 156-63.

Sharikabad MN, Ostbye MO, Brors O. Increased $[Mg^{2+}]_o$ reduces Ca^{2+} influx and disruption of mitochondrial membrane potential during reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H2113-23.

Shin M, Song S H, Kim JM, Kim SJ, Joh JW, Lee SK, Kwon C H D. Effectiveness of Intraportal Prostaglandin E1 Administration After Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings.* 2012; (44) 500-04.

Silva JCF, Simão DT, Lima LG, Cunha MS, Wada A, Nakamoto H, Ferreira MC. Modelo experimental de reimplante de membro após isquemia quente em ratos e efeito da estreptoquinase, alopurinol e terapia com oxigênio hiperbárico. *S Paul Med J.* 2001; 80(2/4):78-88.

Silveira M, Yoshida WB. Ischemia and reperfusion in skeletal muscle injury mechanisms and treatment perspectives. *J Vasc Bras.* 2004; 4(2): 367-78.

Sparkes BL, Slone EE, Roth M, Welti R, Fleming SD. Intestinal lipid alterations occur prior to antibody-induced prostaglandin E2 production in a mouse model of ischemia/reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801(4): 517-25.

Takamori M, Yagi M, Onoda H, Yabushita K, Ohhori I, Tomita H, Konishi K, Miyazaki I. An Experimental Study for Preservation of the Small Intestine: Special Reference to

Mucosal Na⁺-K⁺ ATPase Activity in Small Intestinal Ischemia. *Transplant Proc.* 1989; 21(3): 2903-05.

Teruya R, Fagundes DJ, Oshima CTF, Brasileiro JL, Marks G, Ynouye CM, Simões MJ. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(1): 29-35.

Teruya R. Estudo de aspectos morfológicos e funcionais do rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão de músculo esquelético, sob a ação da pentoxifilina. [Tese-Mestrado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Teti KC, Ozden A, Calli N, Bilgihan A, Bostanci B, Ozgiir YS, Bayramoglu H. Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int.* 1999; 12: 108-12.

Topcu I, Vatansever S, Varcn A, Cavus Z, Cilaker S, Sakarya M. The effect of Misoprostol, a prostaglandin E1 analog, on apoptosis in ischemia-reperfusion-induced intestinal injury. *Acta Histochemica.* 2007; 109:322-29.

Uhle VA, Piccinato CE, Campos AD, Cherri J. Efeito do meloxicam sobre a lesão de isquemia e reperfusão em músculo esquelético de ratos. *Acta Cir Bras.* 2000;15(2):23-30.

Victoni, T. Avaliação dos mecanismos indutores da inflamação pulmonar decorrente da isquemia e reperfusão intestinal em camundongos geneticamente selecionados. [Dissertação - Mestrado], São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008.

Veltkamp R, Siebing DA, Heiland S, Schoenfeldt-Varas P, Veltkamp C, Schwaninger M, Schwab S. Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2005;1037(1-2):134-8.

Walensi W, Groot H, Schulz R, Hartmann M, Petrat F. Mesenteric ischemia-reperfusion injury: Clearly improved hemodynamics but only minor protection of the

rat small intestine by (sub)therapeutic heparin sodium and enoxaparin doses. *Journal of Surgical Research*. 2013; 179(1): 57–69.

Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A, Fujimoto K. iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 33(5): 649-58.

Wu B, Iwakiri R, Ootani A, Fujise T, Tsunada S, Fujimoto K. Platelet activating factor promotes mucosal apoptosis via FasL mediating caspase-9 active pathway in rat small intestine after ischemia-reperfusion. *The FASEB Journal express article*. 2003; (10): 849-66.

Xia G, Martin AE, Besner GE. Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor Downregulates Expression of Adhesion Molecules and Infiltration of Inflammatory Cells After Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Pediatr Surg*. 2003; 38: 434-39.

Xue L, Aihara E, Wang T, Montrose MH. Trefoil Factor 2 Requires Na/H Exchanger 2 Activity to Enhance Mouse Gastric Epithelial Repair. *J. Biol. Chem*. 2011; 286(44): 375-82.

Yuan Y, Guo H, Zhang Y, Zhou D, Gan P, Liang DM, Chen JY. Protective Effects of L-Carnitine on Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Model. *J Clin Med Res*. 2011; 3(2): 78-84.

Zárate P; Andrade SMO; Aydos RD. Diretrizes para elaboração de Teses e Dissertações. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. 2. Ed. Campo Grande: UFMS, 2011. NBR 14724 (ABNT, 2005).

9 APÊNDICE

Tabela 1 - Análise histológica apresentando a classificação de Chiu para os graus zero a 5 de lesão da mucosa intestinal dos indivíduos submetidos à isquemia e reperfusão de intestino delgado nos Grupos Controle(A), PTX(B), PGE1(C) e Sham(D)

10 Ratos	Controle	PTX	PGE1	Sham
1	4	3	1	0
2	5	1	3	1
3	3	3	2	0
4	5	3	2	1
5	4	3	3	0
6	2	3	2	
7	3	2	2	
8	4	3	3	
9	5	2	2	
10	5	2	1	
Média±dp	4,0±1,1	2,5±0,7	2,1±0,7	0,4±0,5

Tabela 2 - Análise estatística comparação intergrupo da avaliação imunohistoquímica das criptas da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Contagem das **células coloridas em marrom** (expressão do anti-FAS ligante) nos quatros grupos. Valores expressos em média e desvio-padrão comprovado pelo teste de Tukey.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	ANOVA Intergrupos	Tukey	Valor p
Cripta a	70.1±22.4	16.8±3.2	11.7±1.8	2.4±0.5	<0,0001	Grupo A vs Grupo B	<0,01
Cripta b	80.8±13.6	16.0±2.7	11.0±1.6	2.2±1.6		Grupo A vs Grupo C	<0,01
Cripta c	79.7±19.8	16.7±3.1	11.6±1.8	2.4±0.5		Grupo A vs Grupo D	<0,01
Cripta d	84.8±9.1	17.3±2.3	10.8±1.9	2.8±0.8		Grupo B vs Grupo C	<0,05
Cripta d	84.8±9.1	17.3±2.3	10.8±1.9	2.8±0.8		Grupo B vs Grupo D	<0,01
Média final	78,9±17,3	16,7±2,8	11,3±1,8	2,5±0,9		Grupo C vs Grupo D	<0,01
ANOVA Intragrupo	0,2781	0,7876	0,6249	0,8247			
	Ns	ns	ns	ns			

Tabela 3 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, e analisadas no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas nas criptas analisadas com a média final do **Grupo A**.

Grupo A	Cripta Aa	Cripta Ab	Cripta Ac	Cripta Ad
Rato 1	1Aa=54	1Ab=95	1Ac=97	1Ad=84
Rato 2	2Aa=48	2Ab=72	2Ac=47	2Ad=79
Rato 3	3Aa=74	3Ab=72	3Ac=69	3Ad=73
Rato 4	4Aa=45	4Ab=56	4Ac=49	4Ad=69
Rato 5	5Aa=46	5Ab=84	5Ac=102	5Ad=95
Rato 6	6Aa=96	6Ab=77	6Ac=78	6Ad=87
Rato 7	7Aa=92	7Ab=95	7Ac=87	7Ad=93
Rato 8	8Aa=107	8Ab=102	8Ac=103	8Ad=97
Rato 9	9Aa=74	9Ab=77	9Ac=83	9Ad=86
Rato 10	10Aa=65	10Ab=78	10Ac=82	10Ad=85
Total	701	788	748	848
Médias	70,10	78,80	74,80	84,80
Média final	77,12			

Tabela 4 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, e analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em criptas analisadas com a média final do **Grupo B**.

Grupo B	Cripta Ba	Cripta Bb	Cripta Bc	Cripta Bd
Rato 1	1Ba=22	1Bb=21	1Bc=23	1Bd=19
Rato 2	2Ba=21	2Bb=18	2Bc=19	2Bd=16
Rato 3	3Ba=19	3Bb=17	3Bc=19	3Bd=20
Rato 4	4Ba=18	4Bb=17	4Bc=14	4Bd=19
Rato 5	5Ba=13	5Bb=12	5Bc=15	5Bd=18
Rato 6	6Ba=17	6Bb=15	6Bc=14	6Bd=18
Rato 7	7Ba=15	7Bb=13	7Bc=14	7Bd=13
Rato 8	8Ba=16	8Bb=17	8Bc=18	8Bd=14
Rato 9	9Ba=13	9Bb=17	9Bc=14	9Bd=18
Rato 10	10Ba=14	10Bb=13	10Bc=17	10Bd=18
Médias	14,60	13,90	12,50	14,90
Média final	13,97			

Tabela 5 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido um campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, e analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante), calculando as médias em cada subgrupo das criptas analisadas com a média final do **Grupo C**.

Grupo C	Cripta Ca	Cripta Cb	Cripta Cc	Cripta Cd
Rato 1	1Ca=9	1Cb=10	1Cc=11	1Cd=9
Rato 2	2Ca=13	2Cb=12	2Cc=11	2Cd=10
Rato 3	3Ca=13	3Cb=12	3Cc=13	3Cd=9
Rato 4	4Ca=10	4Cb=11	4Cc=13	4Cd=11
Rato 5	5Ca=14	5Cb=9	5Cc=12	5Cd=13
Rato 6	6Ca=11	6Cb=13	6Cc=12	6Cd=9
Rato 7	7Ca=12	7Cb=13	7Cc=9	7Cd=11
Rato 8	8Ca=13	8Cb=11	8Cc=9	8Cd=14
Rato 9	9Ca=13	9Cb=11	9Cc=11	9Cd=9
Rato 10	10Ca=9	10Cb=8	10Cc=15	10Cd=13
Médias	11,70	11,00	10,50	10,80
Média final	11,00			

Tabela 6 - Critérios de avaliação da imunohistoquímica da mucosa de intestino delgado de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Escolhido um campo aleatório com quatro criptas denominadas de **a, b, c, d**, da esquerda para direita, no campo analisado no microscópio. Em seguida, realizada a contagem das células coloridas em marrom (expressão do anti-FAS ligante), calculando as médias em cada subgrupo das criptas analisadas com a média final do **Grupo D ou Sham**.

Grupo D	Cripta Da	Cripta Db	Cripta Dc	Cripta Dd
Rato 1	1Da=2	1Db=1	1Dc=3	1Dd=2
Rato 2	2Da=3	2Db=4	2Dc=2	2Dd=3
Rato 3	3da=2	3Db=3	3Dc=2	3Dd=4
Rato 4	4Da=2	4Db=3	4Dc=3	4Dd=2
Rato 5	5Da=3	5Db=0	5Dc=2	5Dd=3
Médias	2,40	2,20	2,40	2,80
Média final	2,50			

10 ANEXOS**PROTOCOLO DE PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS DA PESQUISA**

Data ____/____/____ Grupo ____ Número ____

Sexo ____ Peso ____ Idade ____

Anestésico e tipo ____ Volume ____ Dose ____

Analgésico ____ Volume ____ Dose ____

Pentoxifilina ____ Volume ____ Dose ____

Prostaglandina E1 ____ Volume ____ Dose ____

Descrição do ato operatório: _____

Isquemia Início ____ Final ____

 Duração _____

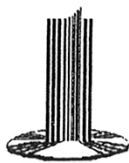
Reperusão Início ____ Final ____

 Duração _____

Coleta de dados

Resultado da Microscopia Óptica _____

Resultado da imunohistoquímica _____



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 308 do Pesquisador José Lacerda Brasileiro referente ao projeto de pesquisa, **“Estudo morfológico e imunohistoquímico em intestino desligado de ratos submetidos ao fenômeno de isquemia e reperfusão: ação da pentoxifilina e da prostaglandina E₁”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 11 de agosto de 2011.


Drª Joice Stein
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 16 de agosto de 2011

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187