

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**Lesões decorrentes de obstruções experimentais no jejuno de eqüinos
tratados com glutamina ou associação de succinato sódico de
hidrocortisona, dimetilsulfóxido, pentoxifilina
e ácido ascórbico**

Geane Maciel Pagliosa

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009

Geane Maciel Pagliosa

**Lesões decorrentes de obstruções experimentais no jejuno de eqüinos
tratados com glutamina ou associação de succinato sódico de
hidrocortisona, dimetilsulfóxido, pentoxifilina
e ácido ascórbico**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência
Animal.

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Eleno Silveira Alves

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009**

P1381 Pagliosa, Geane Maciel, 1974-

Lesões decorrentes de obstruções experimentais no jejuno de eqüinos tratados com glutamina ou associação de succinato sódico de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e ácido ascórbico / Geane Maciel Pagliosa. – 2009.

66p. : il.

Orientador: Geraldo Eleno Silveira Alves

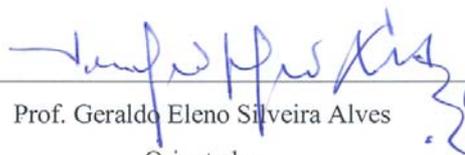
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Eqüino – Cirurgia – Teses. 2. Intestino – Cirurgia – Teses. 3. Intestino – Doenças – Tratamento - Teses. I. Alves, Geraldo Eleno Silveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 971

Tese defendida e aprovada em 05/01/2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Geraldo Eleno Silveira Alves
Orientador



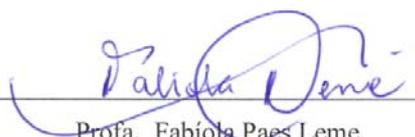
Prof. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk



Prof. José Dantas Ribeiro Filho



Prof. Renato Lima Santos



Profa. Fabíola Paes Leme

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Eleno Silveira Alves, um sábio educador e amigo pela oportunidade e diretriz de meu aprendizado humano e técnico e pelas conquistas, que com certeza não são só minhas, mas nossas, ao longo de sete anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros pela co-orientação e preocupação com meu aprendizado pessoal e melhoria como ser humano, tanto quanto ou acima do profissional.

Ao Pr. Dr. Anilton Vasconcelos pelo exemplo de simplicidade, profissionalismo e caráter e pela co-orientação da tese.

À Profa. Dra. Danielle de Souza pela receptividade sempre atenciosa, pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas e por aceitar compor minha banca de pré-defesa.

Ao Prof. Dr. Renato de Lima Santos pelas orientações nas análises e interpretação dos mediadores inflamatórios e pelo exemplo de profissional e pesquisador, bem como pela concessão do uso do laboratório.

Aos professores e colegas Jorge Rio Tinto e Círyl Alexandre de Marval pela companhia sempre agradável e pelo auxílio na logística para a realização do experimento.

Ao Prof. Mauro Teixeira do laboratório de Imunofarmacologia do ICB-UFMG pela orientação e consentimento de uso do laboratório para realização das análises bioquímicas.

À Profa. Dra. Márcia Bersane Torres pela disponibilização do laboratório de Patologia da UFPR-Campus Palotina para o preparo do material para histopatologia, pelo exemplo profissional e convivência humana em dois anos de trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. Humberto Pereira Oliveira pela convivência agradável e por tantos ensinamentos.

Aos bolsistas Tiago Alves e Heloísa Maria Falcão Mendes pela agradável companhia e o indispensável auxílio e dedicação na realização das análises bioquímicas e dos mediadores inflamatórios.

A acadêmica e bolsista de iniciação científica Renata Costa pelo auxílio nas análises paramétricas intestinais.

A “amigaça” Priscila Fantini por tudo ao longo de sete anos de convivência.

À amiga Rachel Baeta por todo o apoio e estímulo e por toda a ajuda em todos os momentos de minha estada em Belo Horizonte.

À Luciana Camillo pela amizade, apoio e estímulo nos bons e maus momentos de meus primeiros meses no Paraná.

Aos professores Vinícius Cunha Barcelos e Betina Pereira, diretor e coordenadora do curso de Medicina Veterinária da UFPR-Campus Palotina e colegas do Hospital Veterinário pelo apoio e viabilização de minhas saídas para o cumprimento das atividades do doutorado.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro que viabilizou a realização desse experimento.

“A sabedoria consiste em conseguir enxergar além da superfície dos fatos que ocorrem em nossa vida e das atitudes das pessoas que nos cercam”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ANEXOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Obstruções intestinais e mecanismos de lesão tecidual	15
2.1.1. Alterações vasculares e celulares decorrentes das obstruções não estrangulativas	15
2.1.2. Alterações vasculares e celulares decorrentes das obstruções estrangulativas	16
2.1.3. Patofisiologia das obstruções intestinais	16
2.2. Mecanismos de lesão tecidual nas obstruções intestinais em eqüinos	21
2.3. Lesões à distância decorrentes das obstruções intestinais	21
2.4. Terapêutica das lesões de isquemia e reperusão	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais e anestesia	25
3.2. Lesão experimental	25
3.3. Grupos experimentais	26
3.4. Colheita e processamento das amostras	26
3.5. Análises histológicas	27
3.6. Análise ultra-estrutural e mensuração da área, perímetro e número de vilosidades por mm²	29
3.7. Determinação da atividade de mieloperoxidase	29
3.8. Reação de transcrição da polimerase reversa em cadeia em tempo real (RT-PCR) ...	29
3.9. Tratamento estatístico dos dados	30
4. RESULTADOS	30
4.1. Anestesia	30
4.2. Alterações macroscópicas	31
4.3. Análise histopatológica	31
4.3.1. Amostras intestinais	31
4.3.2. Demais órgãos	39
4.4. Análise ultra-estrutural e mensuração da área, perímetro e número de vilosidades por mm²	40
4.5. Atividade de mieloperoxidase (MPO)	41
4.6. Mediadores inflamatórios	41
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Anestesia	49
5.2. Alterações macroscópicas	49
5.3. Alterações microscópicas e atividade de mieloperoxidase	49
5.3.1. Amostras intestinais	49
5.3.2. Demais órgãos	52
5.4. Análise ultra-estrutural e medidas das vilosidades	53
5.5. Mediadores inflamatórios	53
5.6. Tratamentos	54
5.6.1. Glutamina	54
5.6.2. Associação de succinato sódico de hidrocortisona, pentoxifilina, ácido ascórbico e dimetilsulfóxido	55
5.7. Considerações sobre o desenvolvimento das lesões teciduais e terapêutica em Eqüinos	57
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem e mecanismo de ação das moléculas sinalizadoras acionadas durante o processo inflamatório gerado pela hipóxia e reoxigenação	19
Tabela 2. Grupos experimentais e tratamentos em 18 eqüinos submetidos a duas horas isquemia por distensão intraluminal e isquemia venosa completa de jejuno seguida de 12 horas de reperfusão	27
Tabela 3. Escore para erosão de mucosa do jejuno de eqüinos submetidos a isquemia e reperfusão por distensão intraluminal e isquemia venosa completa	28
Tabela 4. Escore para edema, hemorragia e presença neutrófilos polimorfonucleares nas camadas intestinais do jejuno de eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão por distensão intraluminal e isquemia venosa completa	28
Tabela 5. Escore para dilatação de vasos linfáticos e desprendimento de células mesoteliais na serosa do jejuno de eqüinos submetidos a isquemia e reperfusão por modelo de distensão intraluminal do jejuno e isquemia venosa completa de jejuno	28
Tabela 6. Escore para deposição de fibrina na serosa do jejuno de eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão por modelo de distensão intraluminal do jejuno e isquemia venosa completa de jejuno	28
Tabela 7. Escores para lesão de tecido laminar nos dígitos torácicos em 18 eqüinos submetidos a isquemia e reperfusão por obstrução venosa completa e distensão intraluminal de jejuno	28
Tabela 8. Seqüência gênica dos primers da espécie eqüina utilizados para quantificar o TNF- σ e GCP-2 (CXCL6) por PCR em tempo real em eqüinos com obstrução intestinal	30
Tabela 9. Média (M) e desvio padrão (SD) de escores para degeneração do jejuno submetido isquemia venosa completa no tempo basal (T0), após 2h de isquemia, 2 e 12h de reperfusão e no segmento distante após 12h de reperfusão em 18 eqüinos divididos nos grupos controle (C), glutamina (T1) e multimodal (T2) constituído da associação de succinato sódico de hidrocortisona, pentoxifilina, ácido ascórbico e dimetil sulfóxido	33
Tabela 10. Média (M) e desvio padrão (SD) de escores para degeneração do jejuno submetido a distensão intraluminal no tempo basal (T0), após 2h de isquemia, 2 e 12h de reperfusão e no segmento distante após 12h de reperfusão em 18 eqüinos divididos nos grupos controle (C), glutamina (T1) e multimodal (T2) constituído da associação de succinato sódico de hidrocortisona, pentoxifilina, ácido ascórbico e dimetil sulfóxido.	34
Tabela 11. Média e desvio padrão (DP) dos escores de lesão do tecido laminar dos cascos dos membros torácicos esquerdo (CAS AD) e direito (CAS AE) após 12h de reperfusão em 18 eqüinos submetidos simultaneamente a distensão intraluminal e obstrução venosa de jejuno e divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona.	40
Tabela 12. Média (M) e desvio padrão (SD) da atividade de mieloperoxidase (MPO) do jejuno submetido à isquemia venosa e distensão intraluminal de 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona de amostras basal (T0), com 2h de isquemia (I2) e 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12) e em segmento distante à lesão após 12h de reperfusão (R12L).	45
Tabela 13. Média (M) e desvio padrão (SD) da atividade de mieloperoxidase (MPO) das camadas mucosa e submucosa e muscular e serosa do jejuno submetido a distensão intraluminal de 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona de amostras basal (T0), com 2h de isquemia (I2) e 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12).	45
Tabela 14. Valores médios e desvio padrão da atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido laminar dos cascos direito (CAS AD) e esquerdo (CAS AE), pulmão (PUL), pâncreas (PAN), coração (COR), rim (RIM) e fígado(FIG) em 18 eqüinos submetidos simultaneamente à isquemia por distensão intraluminal e obstrução venosa de jejuno e divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de eventos bioquímicos e celulares subsequentes à hipóxia.	17
Figura 2. Períodos de isquemia e reperfusão e tratamentos realizados em 18 eqüinos submetidos a duas horas de isquemia por distensão intraluminal e isquemia venosa completa de jejuno seguida de 12 horas de reperfusão	27
Figura 3. Alterações macroscópicas do jejuno após de 2h de isquemia induzida. 2A - A serosa do segmento sob distensão intraluminal encontra-se hiperêmica e com os vasos mais evidentes. 2B - No segmento sob isquemia venosa completa a coloração da serosa é vermelha escura. 2C – Distensão e hiperemia das artérias e veias jejunais e hemorragia na serosa e mesentério do segmento sob isquemia venosa completa. Eqüino do grupo controle	32
Figura. 4. Média e desvio padrão dos escores de lesão (A) e hemorragia (B) de mucosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05	35
Figura. 5. Média e desvio padrão dos escores de hemorragia das camadas submucosa (A) e muscular (B) do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05	36
Figura. 6. Média e desvio padrão dos escores de hemorragia da serosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05	37
Figura. 7. Média e desvio padrão dos escores do infiltrado de neutrófilos da serosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05	37
Figura. 8. Média e desvio padrão dos escores de infiltrado de neutrófilos da camada muscular do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05.	38
Figura. 9. Média e desvio padrão dos escores de edema de submucosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05.	38

Figura. 10. Média e desvio padrão dos escores de infiltrado de neutrófilos na camada serosa do jejuno sob distensão intraluminal (DIL) em 18 equínos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05. 39

Figura. 11. Média e desvio padrão dos escores de descamação de células mesoteliais na camada serosa do jejuno sob distensão intraluminal (DIL) em 18 equínos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05. 39

Figura 12. Microfotografia de corte histológico do tecido laminar do dígito de equino do grupo controle com escore de lesão 1,5 após 12h de reperfusão em segmentos de jejuno submetidos simultaneamente a distensão intraluminal e isquemia venosa completa. A - Lâminas epidérmicas secundárias (Les) estreitas e ausência das lâminas dérmicas primárias (Ldp) entre as Les (*). H&E, Ob. 10x. Núcleo das células basais arredondados (seta) e próximos à membrana basal (seta) (B) H&E, Ob. 40x. 40

Figura 13 – Microfotografia de corte histológico de tecido pulmonar após 12h de reperfusão em segmentos de jejuno submetidos simultaneamente à distensão intraluminal e isquemia venosa completa. (A) Presença de eosinófilos (setas) e (B) exsudato bronquiolar com presença de neutrófilos característicos de lesão prévia. (C) Infiltrado de neutrófilos discreto no parênquima pulmonar (setas) indicativo de lesão pulmonar decorrente de reperfusão intestinal (C). H&E, Ob. 40x. 41

Figura 14 - Microfotografia evidenciando a progressão da erosão de mucosa pela microscopia óptica (A, B, C, D) e imagens de microscopia eletrônica de varredura (A', B', C', D'). A, A' – Escore 0 (tempo 0): mucosa íntegra (A - H&E, 31,2x e A' - 150x). B, B' - Escore 3 (2h de isquemia): exposição da lâmina própria até a metade da extensão das vilosidades (B - H&E, 75x e B' - 150x). C, C' - Escore 4 (2h de reperfusão): exposição da lâmina própria até a base das vilosidades (C - H&E, 75x e C' - 150x). D, D' - Vilosidades curtas, mas com recobrimento de células epiteliais (12h de reperfusão) (D - H&E, 100x e D' - 150x). Equino do Grupo Controle. 42

Figura 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciando aspectos das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal. Aspecto normal das vilosidades com rugosidades características no tempo 0 (A). Após 2h de isquemia, as rugosidades das vilosidades são menos evidentes (B). Às 2h de reperfusão as rugosidades são ainda menos evidentes e as vilosidades encontram-se levemente achatadas (C). Após 12h de reperfusão, as vilosidades encontram-se visivelmente retraídas (D). Equino grupo controle. Escore zero (0) para erosão de mucosa à histopatologia. 150x. 43

Figura 16. Valores médios e desvio padrão da área das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal em 18 equínos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos P<0,05. 43

Figura 17. Valores médios e desvio padrão do perímetro das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal em 18 equínos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05. 44

Figura 18. Valores médios e desvio padrão do número das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05. 44

Figura 19. Média e desvio padrão da atividade de mieloperoxidase (MPO) do jejuno sob distensão intraluminal (DIL) (A) e isquemia venosa completa (IVC) (B) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo tempo. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P < 0,05. 46

Figura 20. Média e desvio padrão da atividade de mieloperoxidase (MPO) no jejuno sob distensão nas camadas mucosa e submucosa (A) e nas camadas muscular e serosa (B) às 2h de isquemia (I2) e 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12, respectivamente), nos 18 eqüinos dos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si no mesmo tempo. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P < 0,05. 47

Figura 21. Valores médios da variação da expressão de mRNA para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ) nos segmentos de jejuno sob distensão intraluminal (DIL) e isquemia venosa completa (IVC) do grupo controle às 2h de isquemia (I2), e as 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12, respectivamente), em relação ao tempo basal considerado igual a um (1). 48

Figura 22. Valores médios da variação da expressão de mRNA para a proteína quimiotática de granulócitos 2 (GCP-2) nos segmentos de jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) e distensão intraluminal (DIL) do grupo controle às 2h de isquemia (I2), e as 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12, respectivamente), em relação ao tempo basal considerado igual a um (1). 48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Curvas de RT-PCR (reação de transcrição da polimerase reversa em cadeia em tempo real) para fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ) indicando o número de ciclos (Ct – “cycle threshold”) de uma amostra individual (A) e de todas as amostras (B) de jejuno sob isquemia venosa completa dos eqüinos do grupo controle 65

Anexo 2. Curvas de RT PCR (reação de transcrição da polimerase reversa em cadeia em tempo real) para fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ) indicando a temperatura de fusão (Tm – “melting curve”) de uma amostra individual (A) e de todas as amostras (B) de jejuno sob isquemia venosa completa dos eqüinos do grupo controle 66

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico
ATP – trifosfato de adenosina
AMP – monofosfato de adenosina
AMPc – AMP cíclico
cDNA – ácido desoxidoribonucleico complementar
cmH₂O – centímetros de água
COX-2 – ciclooxigenase 2
DIL – distensão intraluminal
DMSO – dimetilsulfóxido
GCP-2 – proteína quimiotática de granulócitos 2
h – hora
IAVC – isquemia arterio-venosa completa

IFN- γ – interferon gama
I κ β – fator de inibição kappabeta
IL- 1 – interleucina 1
IL- 6 - interleucina 6
IL- 8 – interleucina 8
iNOS- óxido nítrico sintase indutível
IRAK-4 – interleucin-1receptor associated kinase
I/R – isquemia e reperfusão
IVC – isquemia venosa completa
K⁺ - íon potássio
kV - quilovolts
LBP – proteína ligante de lipopolissacarídeo
Ldp – lâmina dérmica primária
Lds – lâmina dérmica secundária
Lep – lâmina epidérmica primária
Les – lâmina epidérmica secundária
LPS – lipopolissacarídeo
M - média
mA – miliampere
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MODS – síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
MPO – mieloperoxidase
Na⁺ - íon sódio
NADPH - adenina dinucleotídeo nicotina fosfato hidrogenase
NF- κ β – fator nuclear kappa beta
nM – nanomoles
NO – óxido nítrico
NOi – óxido nítrico indutível
Nt – neutrófilos
O₂ – oxigênio
OAV- obstrução arteriovenosa
OVC – obstrução venosa completa
PAF – fator de agregação plaquetária
PLA₂ – fosfolipase A₂
PTX – pentoxifilina
RNA – ácido ribonucleico
RLO – radicais livres de oxigênio
RT-PCR – reação da polimerase reversa em cadeia em tempo real
SD – desvio padrão
SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SSH – succinato sódico de hidrocortisona
TB – translocação bacteriana
TLR-4 – receptor do tipo *Toll* (*Toll-like receptor*)
TNF- σ – fator de necrose tumoral alfa
XDH – xantina desidrogenase
XO – xantina oxidase

RESUMO

Sob anestesia geral e com controle da pressão arterial, 18 eqüinos foram submetidos simultaneamente a modelos de isquemia venosa completa e distensão intraluminal de segmentos do jejuno por 2h seguidos de 12h de reperfusão. Seis eqüinos (grupo T1) foram tratados com glutamina a 2% (50mg/Kg), seis (grupo T2) com a associação de succinato sódico de hidrocortisona (4mg/Kg), pentoxifilina (8mg/Kg), ácido ascórbico (50mg/Kg) e dimetilsulfóxido (20mg/Kg) e seis (grupo C) com solução de ringer lactato por via intravenosa. Os tratamentos foram realizados 1h após o início da isquemia, sendo que a glutamina foi também administrada na sexta hora de reperfusão, momento no qual os animais dos demais grupos receberam solução de ringer lactato. Foram colhidas amostras intestinais antes e com 2h de isquemia e com 2 e 12h de reperfusão, sendo neste último tempo também colhidas amostras de pulmão, fígado, rim, pâncreas, coração, e cório laminar dos membros torácicos para avaliações histológica e da atividade de mieloperoxidase (MPO). Nos intestinos também se realizou análise ultraestrutural, mensuração do número, área e perímetro das vilosidades e avaliação da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ), da interleucina 8 (IL-8) e da proteína quimiotóxica de granulócitos 2 (GCP-2). Para nenhuma das variáveis houve diferença estatística entre grupos, no entanto, nos grupos T1 e T2 houve diminuição significativa da erosão de mucosa após 12h de reperfusão e da hemorragia de mucosa após 2h de reperfusão no segmento submetido à isquemia venosa completa, sinalizando uma tendência de reparo mais precoce e menor intensidade de alterações vasculares. Os tratamentos avaliados, nas condições em que foram empregados neste experimento, atenuam a erosão e a hemorragia de mucosa no jejuno submetido a isquemia e reperfusão por obstrução venosa completa em eqüinos.

Palavras-chave: eqüino, obstrução intestinal, hidrocortisona, pentoxifilina, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico, glutamina.

ABSTRACT

Under general anesthesia and arterial pressure control, eighteen horses were submitted simultaneously to distension and complete venous ischemia of jejunum for two hours, followed by twelve hours of reperfusion. Six horses (T1 group) were treated with intravenous 2% glutamine (50mg/Kg), six horses (T2 group) were treated with an association of hydrocortisone succinate (4mg/Kg), pentoxifylline (8mg/Kg), ascorbic acid (50mg/Kg) and dimethylsulfoxide (20mg/Kg), and six horses (group C) were treated with ringer lactate solution in same volume. The treatments were performed at 1h after the beginning of ischemia and glutamine was also administered at 6h after reperfusion, when the other groups received ringer lactate solution. Intestinal samples were collected before the onset of ischemia and at 2h of ischemia and, in at 2 and 12h of reperfusion for histopathological analyses, ultrastructural examination, measurement of area and number of villus per mm², myeloperoxidases activity and tumor necrosis factor alpha (TNF- σ) and granulocytes chymotaxin protein 2 (GCP-2) expression analysis. After 12h of reperfusion samples of lungs, kidney, spleen, heart, pancreas, liver and lamellar corium tissue were also collected for histopathological and MPO evaluation. There were no statistical differences between groups, therefore, along the time in groups T1 and T2 in venous ischemia segment, the mucosal erosion at 12h of reperfusion and hemorrhage at 2h of reperfusion were statistically lower. It was concluded that the treatments attenuated the mucosal erosion and hemorrhage caused by ischemia and reperfusion in jejunum under complete venous obstruction in equine.

Keywords: equine, intestinal obstruction, hydrocortisone, pentoxifylline, dimethylsulfoxide, ascorbic acid, glutamine.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome cólica é uma das afecções de maior prevalência em equinos podendo acarretar prejuízos significativos devido ao custo elevado do tratamento e a possibilidade de óbito. As cólicas podem ser causadas por vários mecanismos, sendo as obstruções responsáveis por 56% de sua ocorrência, com taxas de óbito de 21 e 76%, quando simples ou estrangulantes, respectivamente (White, 1990). As obstruções comprometem a circulação intestinal podendo acarretar lesões teciduais que se perpetuam durante a reperfusão, mesmo em segmentos distantes à lesão (Rio Tinto et al., 2000).

As lesões teciduais decorrentes das obstruções são iniciadas pela hipóxia, a qual desencadeia uma série de eventos fisiopatológicos seqüenciais e interdependentes. Com a reoxigenação após a correção cirúrgica, as lesões geradas pela hipóxia se agravam, aumentando a resposta inflamatória inicial, o que pode ocasionar uma reação sistêmica e possibilidade de disfunção em múltiplos órgãos. Devido à complexidade desses eventos, os fármacos mais indicados são aqueles que possuem diferentes mecanismos de ação ou, ainda, que se faça uso de uma associação de fármacos com funções distintas ou complementares. Em equinos, estudos avaliando a eficácia de associações terapêuticas são escassos e aqueles avaliando agentes isolados apresentaram resultados pouco satisfatórios ou limitados (Freeman et al., 1988; Horne et al., 1994; Moore et al., 1995; Rio Tinto, 1999; Abreu, 2003).

Os objetivos gerais deste trabalho foram de avaliar os seguintes aspectos: as alterações teciduais subseqüentes às obstruções simples e estrangulativas no jejuno; a ocorrência de lesões em órgãos à distância em decorrência de obstruções intestinais e os mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento das lesões intestinais e em órgãos à distância. O objetivo específico foi avaliar o efeito da glutamina e da associação de succinato sódico de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e ácido ascórbico no tratamento das lesões decorrentes de obstruções experimentais no jejuno de equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obstruções intestinais e mecanismos de lesão tecidual

As obstruções intestinais ocasionam um comprometimento do fluxo sanguíneo venoso e/ou arterial, o que acarreta graus variáveis de hipóxia. Tal situação inicia uma complexidade de múltiplos eventos simultâneos e interdependentes caracterizados por alterações vasculares e celulares que culminam em aumento da permeabilidade vascular e lesão tecidual com morte celular. A magnitude dessas alterações, bem como as camadas intestinais mais acometidas, varia de acordo com o tipo de obstrução concomitante.

2.1.1. Alterações vasculares e celulares decorrentes de obstruções intestinais não estrangulativas

Nas obstruções não estrangulativas de intestino delgado, a irrigação é comprometida pela distensão intraluminal (DIL) decorrente, principalmente, do acúmulo de líquido e gás (Faleiros, 2003). A DIL ocasiona a hipoperfusão arterial e venosa nas camadas mais externas do intestino e, em menor extensão, na mucosa e submucosa, razão pela qual as alterações observadas nessas são de intensidade menor (Dabareiner et al., 1993).

A distensão experimental de jejuno com pressão de 25cm de H₂O por duas horas em equinos, ocasionou uma redução na perfusão das camadas seromuscular, com formação de edema, infiltrado de neutrófilos na serosa e perda de células mesoteliais (Dabareiner et al., 1993). O edema ocorre devido ao aumento da pressão hidrostática capilar após elevação da pressão venosa que colabora para a dilatação de vasos linfáticos e colapso da parede das vênulas (Granger et al., 1980). Foram observadas também alterações morfológicas e separação das células endoteliais dos vasos da serosa com conseqüente aumento de permeabilidade vascular (Dabareiner et al., 2001). Normalmente, não são observadas alterações no epitélio da mucosa intestinal (Faleiros, 2003).

O intestino sob distensão intraluminal não possui alterações macroscópicas importantes, o que faz com que seja mantido no abdômen durante o ato operatório (Freeman et al., 1988). No entanto, as alterações celulares nas camadas externas do intestino podem ser de tal magnitude que levem à ocorrência de complicações no pós-operatório, como as aderências (Debareiner et al., 2001).

2.1.2. Alterações vasculares e celulares decorrentes de obstruções intestinais estrangulativas

As obstruções estrangulativas podem acometer a circulação venosa, arterial ou ambas. As alterações macroscópicas e microscópicas encontradas em casos de obstrução de ocorrência natural em equinos são mais semelhantes às produzidas experimentalmente por meio de obstrução venosa completa (OVC) do que pela obstrução arteriovenosa (OAV) (Ruggles et al., 1993). Devido a esse fato, considera-se que a OVC possui uma importância clínica maior (Moore et al., 1995).

Macroscopicamente, as obstruções estrangulativas por OVC ocasionam aumento mais acentuado do edema e hemorragia de mucosa, serosa e mesentério que a OAV. As alterações no mesentério colaboram para a ocorrência de seu encurtamento após 42 dias da obstrução (Freeman et al., 1988). Com relação às alterações microscópicas, as lesões de mucosa na OVC e OAV são semelhantes às 2 ou 12h de reperfusão e ocorrem predominantemente na extremidade dos vilos e, em menor extensão, nas criptas. No entanto, o edema e hemorragia na mucosa são mais acentuados na OVC (Freeman et al., 1988).

2.1.3. Patofisiologia das obstruções intestinais

Independente do tipo de obstrução que acomete o segmento intestinal, o resultado é a hipóxia (Vasconcelos, 2002). A diminuição da tensão de oxigênio inicia as lesões observadas durante a isquemia, que são posteriormente agravadas durante a reoxigenação subsequente à correção cirúrgica (Fig. 1). Tais lesões são desencadeadas por dois eventos interdependentes: a inflamação e o estresse oxidativo, ambos presentes tanto na isquemia quanto na reperfusão.

O oxigênio (O₂) é necessário para a formação de trifosfato de adenosina (ATP) através da

fosforilação oxidativa na mitocôndria. A diminuição do O₂ cessa a produção de ATP, o que ocasiona a diminuição intracelular dessa molécula. Para manter a homeostase, a célula utiliza a glicólise anaeróbica, uma via alternativa de produção de ATP, ativada pelo aumento de monofosfato de adenosina (AMP). A glicólise gera ácido láctico e fosfatos inorgânicos, os quais diminuem o pH intracelular, inibindo a síntese de ATP (Moore et al., 1995).

A diminuição de ATP intracelular prejudica o transporte ativo através da membrana mediado pela bomba de Na⁺/K⁺ ATPase, o que acarreta alterações na permeabilidade da membrana celular e conseqüente influxo de sódio e cálcio e efluxo de potássio. O aumento de sódio ocasiona a difusão de água para o interior da célula, resultando em edema, desintegração da mitocôndria, do retículo endoplasmático e ruptura de lisossomas com a liberação de enzimas contidas em seu interior (Pinheiro et al., 1999). O aumento de cálcio ativa certas enzimas, como as proteases, a fosfolipase A₂ (PLA₂) e a calpaína. As proteases resultam lesão celular direta através da degradação da membrana celular, da cromatina e do citoesqueleto (Rowe e White, 2002). A PLA₂ é necessária para a síntese de mediadores inflamatórios derivados de fosfolipídeos de membrana que irão ocasionar danos à célula já na isquemia (Pinheiro et al., 1999). A calpaína realiza a conversão da xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO) durante a isquemia, mas a conseqüência desse evento nas lesões teciduais se inicia durante o período de reoxigenação (Moore et al., 1995).

O aumento do cálcio iônico no citosol promove também o fechamento das junções *gap*, importante meio de comunicação intercelular por onde pequenas moléculas como o AMPc e o próprio íon cálcio transitam livremente. O AMPc é um segundo mensageiro em vários eventos celulares, realizando a ativação de proteínas responsáveis pela fosforilação de moléculas que atuam em eventos finais de proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, assim como no metabolismo da glicose (Lodish et al., 2000). O íon cálcio colabora para a peristalse intestinal estimulando a contração harmônica da musculatura lisa via junções *gap*. A atonia pode ocorrer mesmo quando há aumento discreto de cálcio ou quando há queda do pH intracelular, ambas situações que ocorrem durante a hipóxia (Lodish et al., 2000).

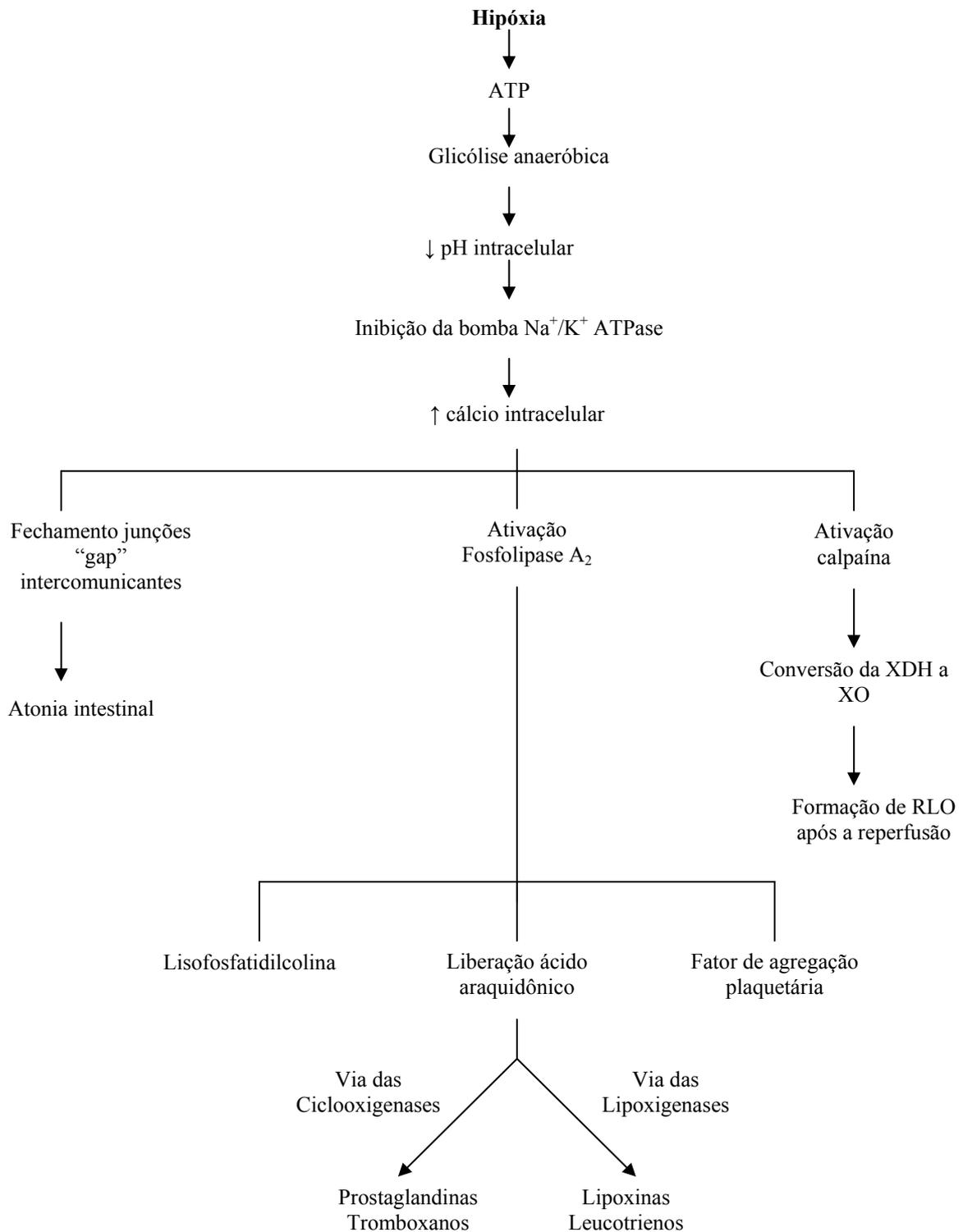


Figura 1. Esquema de eventos bioquímicos e celulares subseqüentes à hipóxia. (ATP – trifosfato de adenosina; XDH – xantina desidrogenase; XO – xantina oxidase; RLO– radical livre de oxigênio).

As células mais precocemente afetadas pela hipóxia sejam as células endoteliais e os leucócitos (Pinheiro et al., 1999). Quando expostas à hipóxia, as células endoteliais alteram seu citoesqueleto e suas formas, gerando pequenos poros intercelulares, o que determina um aumento da permeabilidade local, com conseqüente edema tecidual (Ogawa et al., 1990). O endotélio sob hipóxia produz as interleucinas 1 e 8 (IL-1 e IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ) e fator de agregação plaquetária (PAF), o que favorece a migração, adesão e ativação de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular (Faller, 1999; Michiels et al., 2000). A hipóxia também induz a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) via ativação do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B) pelas células endoteliais (Michiels et al., 2000). A COX-2 irá gerar tromboxanos e o NF- κ B codifica a transcrição de genes que culminam com a formação e liberação de citocinas (Tab. 1).

A hipóxia também afeta de maneira significativa a integridade das células epiteliais que recobrem a mucosa intestinal. Essas células possuem uma taxa metabólica alta, o que faz com que sejam bastante sensíveis à hipóxia (Moore, 1997), sofrendo todas as alterações celulares já descritas decorrentes da depleção de ATP, as quais ocasionarão a morte celular (Rowe e White, 2002). Esse efeito inicia na extremidade das vilosidades, progredindo em direção às criptas quanto mais prolongado for o período de hipóxia. A lesão do epitélio intestinal estimula células epiteliais adjacentes a produzir citocinas que irão aumentar o recrutamento de neutrófilos e a permeabilidade vascular, colaborando para a intensificação das lesões (Blikslager et al., 2007).

Durante a hipóxia, a ativação da PLA₂, além de lesar a célula por hidrólise de fosfolípidos de membrana, também libera o ácido araquidônico, um constituinte da membrana celular, e regula a formação de lisofosfolípidos como a lisofosfatidilcolina e o PAF (Moore et al., 1995) (Fig. 1). O ácido araquidônico é um substrato para síntese de eicosanóides, substâncias que atuam como mediadores inflamatórios. A partir do ácido araquidônico, pela via da enzima ciclooxigenase, são produzidos prostaglandinas e tromboxanos e, pela via da lipoxigenase, as lipoxinas e leucotrienos (Tab. 1). Essas substâncias irão ativar plaquetas, leucócitos, células endoteliais e moléculas de adesão, gerando vários eventos inflamatórios como aderência, quimiotaxia e degranulação de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e produção de radicais livres (Rowe e White, 2006). A lisofosfatidilcolina, um

surfactante de ocorrência natural no intestino, induz lesão de mucosa quando em altas concentrações, ocasionando aumento da permeabilidade intestinal a macromoléculas (Tagesson et al., 1985). O uso de inibidores da PLA₂ na isquemia intestinal de ratos e felinos diminuiu a concentração de lisofosfatidilcolina e atenuou as lesões de mucosa (Otamiri et al., 1987, Otamiri et al., 1988).

O PAF é derivado de fosfolípidos de membrana pela ativação da PLA₂ de vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, plaquetas, neutrófilos e macrófagos. Entre suas ações estão o aumento da aderência, degranulação e produção de radicais superóxido pelos neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular (Moore et al., 1995). O uso de antagonista da PAF diminuiu a aderência leucocitária e a permeabilidade vascular no intestino delgado de felinos sob isquemia e reperfusão (Kubes et al., 1990). Os leucócitos ativados, as plaquetas e as células endoteliais também secretam o PAF que, além de contribuir para os eventos celulares e circulatórios da inflamação, também induz a produção de outros mediadores pelas células inflamatórias locais (Moore et al., 1995).

Além dos mediadores já citados, as citocinas e quimiocinas, outra classe de mediadores inflamatórios, também atuam simultaneamente no processo (Tab. 1). As citocinas são oriundas de leucócitos ativados durante o processo inflamatório, células endoteliais sob hipóxia e células epiteliais. As principais citocinas envolvidas são interleucina 1e 6 (IL-1 e IL-6), o TNF- σ e o interferon gama (IFN- γ) (Michiels et al., 2000). As quimiocinas são estimuladas pelas citocinas e as principais são o IL-8 e a proteína quimiotática para granulócitos 2 (GCP-2) (CXCL6) (Feniger-Barish et al., 2000). Esses mediadores têm ação autócrina, parácrina e endócrina e colaboram para a quimiotaxia, degranulação e liberação de enzimas lisossômicas e radicais livres pelos leucócitos, além de aumento de cálcio no citosol nessas células, ativação da PLA₂ e produção de eicosanóides (Cooper, 2000a) (Tab. 1). As citocinas também estimulam a produção da enzima óxido nítrico indutível (ONi), que produz o óxido nítrico (NO). O NO reage com os RLO formando o íon peroxinitrito, que ocasiona a peroxidação de lipídios de membrana e disfunção mitocondrial, colaborando para aumentar a destruição celular (Bellhorn e Macintire, 2004).

Tabela 1. Origem e mecanismo de ação das moléculas sinalizadoras acionadas durante o processo inflamatório gerado pela hipóxia e reoxigenação.

Molécula	Origem	Mecanismo de ação
PAF	Derivado da membrana lipídica de células lesionadas	Aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária
PLA ₂	Aumento de cálcio intracelular	Liberação do ácido araquidônico e formação de PAF e lisofosfatidilcolina
Lisofosfatidilcolina	PLA ₂ sobre os fosfolípidos de membrana	Lesão direta à membrana celular
Ácido araquidônico	Liberado da membrana celular de células endoteliais, leucócitos, plaquetas, mastócitos e células danificadas pelo PLA ₂	Origina prostaglandinas e tromboxanos pela via das ciclooxigenases e lipoxinas e leucotrienos pela via da lipoxigenase
Prostaglandinas	Sintetizadas a partir do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases	Principalmente a vasodilatação (prostaglandinas I ₂ e E ₂)
Tromboxanos	Sintetizados a partir do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases	Agregação plaquetária e aderência de leucócitos ao endotélio
Leucotrienos	Sintetizados a partir do ácido araquidônico pela via das lipoxigenases	Ativa células endoteliais e leucócito estimulando a quimiotaxia, degranulação e produção de RLO (especialmente o leucotrieno B ₄ – LTB ₄)
Citocinas	Derivadas de leucócitos ativados e células endoteliais sob hipóxia	Aderência de neutrófilos ao endotélio, proliferação, diferenciação e degranulação de neutrófilos (TNF-σ) e macrófagos (IFN-γ); aumento do cálcio intracelular em leucócitos, com subsequente ativação de PLA ₂ e produção de eicosanóides; síntese de fibrinogênio e proteínas do complemento pelo fígado; proliferação de células inflamatórias pela medula. As citocinas mais importantes são TNF, IFN, e interleucinas.
TNF-σ	Leucócitos ativados e células endoteliais sob hipóxia	Aderência, proliferação e degranulação de neutrófilos; formação de RLO; morte celular por apoptose
IFN-γ	Leucócitos ativados e células endoteliais sob hipóxia	Aderência, proliferação e degranulação de macrófagos e formação de RLO
Interleucinas (especialmente IL-1, IL-6 e IL-8)	Leucócitos ativados e células endoteliais sob hipóxia	Aderência, proliferação e degranulação de macrófagos e formação de RLO
Óxido Nítrico	Prozuidos pela enzima ONi estimulada pelas citocinas e células endoteliais sob hipóxia	Peroxidação de fosfolípidos de membrana através do íon peroxinitrito gerado da reação do ON com os RLO; vasodilatação
RLO	Degranulação de neutrófilos e conversão da hipoxantina em ácido úrico e água pela enzima XO, durante a reoxigenação	Peroxidação de fosfolípidos de membrana, retículo endoplasmático e núcleo celular com subsequente destruição celular; formação do íon peroxinitrito com o ON; formação do ácido hipocloroso e hidroxila
Mieloperoxidase COX-2	Degranulação de neutrófilos Células endoteliais sob hipóxia, ativação do ácido araquidônico em células lesionadas	Formação do ácido hipocloroso a partir dos RLO Síntese de prostaglandinas e tromboxanos
NF-κβ	Células endoteliais sob hipóxia	Transcrição de genes que culminam na síntese e liberação de citocinas

PAF – fator de agregação plaquetária; PLA₂ – fosfolipas A2, TNF-σ – fator de necrose tumoral alfa; IFN-γ – interferon gama. TNF-σ – fator de necrose tumoral alfa; IFN-γ – interferon gama; ONi- óxido nítrico indutível; IL- interleucina; XO- xantina oxidase. RLO – radicais livres de oxigênio; COX-2 – ciclooxigenase 2; NF-κβ – fator de transcrição nuclear kappa beta

Fonte: Flaherty e Weisfeldt, 1988; Michiels et al., 2000; Lodish et al., 2000; Cooper, 2000a.

Adicionalmente, leucócitos e plaquetas também liberam aminas vasoativas, como histamina e serotonina, as quais irão aumentar mais a permeabilidade vascular. Leucócitos ativados também liberam proteases como as metaloproteinases, que destroem a matriz celular. As células inflamatórias também geram RLO, evento que ocorre durante a fagocitose, a partir de uma oxidase ligada a NADPH e o NO estimuladas pelas citocinas IL-1, TNF e IFN- γ . Os RLO produzidos pelos leucócitos podem gerar outros agentes oxidantes, como o ácido hipocloroso, cuja formação é mediada pela enzima mieloperoxidase em neutrófilos, ou radicais hidroxila, via reação de Haber-Weis, em macrófagos. O ácido hipocloroso, ao reagir com os RLO também forma o íon peroxinitrito, aumentando a destruição celular (Jones et al. 1997) (Tab. 1).

Durante a reoxigenação, no entanto, os mecanismos de lesão se ampliam especialmente pela formação de RLO mediada pela XO, convertida de forma irreversível por meio da calpaína a partir da XDH, durante a isquemia (Pinheiros et al., 1999). A XDH, normalmente presente na célula em homeostase, converte a hipoxantina, um subproduto da quebra do ATP, em ácido úrico e água para posterior excreção renal. A enzima XO também realiza essa conversão, no entanto, necessita do oxigênio como molécula aceptora de elétrons e, quando este é fornecido durante a reperfusão, formam-se como subprodutos os RLO, oxidantes com grande capacidade de lesão tecidual (Moore et al., 1995). Esses RLO gerados a partir da XO, além de aumentar a lesão celular também ativam a PLA₂, estimulam a quimiotaxia de mais células inflamatórias, interagindo com seus subprodutos, como o NO derivado dos leucócitos (Flaherty e Weisfeldt, 1988).

Os RLO envolvidos na lesão de reperfusão são o ânion superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (OH⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, apesar de não ser um radical, participa da síntese de O₂⁻ e OH⁻ (Flaherty e Weisfeldt, 1988; Cotran et. al., 1994). Os RLO são caracterizados pela presença de um elétron não pareado na última órbita, o que lhes confere uma capacidade alta de reagir com qualquer constituinte bioquímico da célula, mas, especialmente, os lipídios do citoplasma e membrana celular, as proteínas estruturais ou enzimáticas e o ácido nucléico, resultando em

lesão celular direta e irreversível (Flaherty e Weisfeldt, 1988; Pinheiro et al., 1999). A peroxidação lipídica gerada pelos RLO também promove a ativação da PLA₂ durante o período de reoxigenação, aumentando ainda mais a síntese de eicosanóides, conforme mecanismo já exposto (Pinheiro et al., 1999)

Durante a reoxigenação, os leucócitos também participam da lesão tecidual por meio das substâncias liberadas a partir de sua degranulação, muitas das quais são radicais livres. Os polimorfonucleares possuem a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH-oxidase), capaz de reduzir o oxigênio, gerando o ânion superóxido (Pinheiro et al., 1999). Essas células também secretam a mieloperoxidase, enzima que catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCL), a partir da oxidação do íon cloro na presença de peróxido de hidrogênio (Jones et al., 1997). O HOCL reage com aminas, gerando as cloraminas, potentes oxidantes (Pinheiro et al., 1999). Os leucócitos também produzem enzimas proteolíticas, como elastase, colagenase e gelatinase, que participam da lesão tecidual e destruição da matrix extracelular (Jones et al., 1997).

Adicionalmente, outro efeito já demonstrado após um período de hipóxia é a falência de reperfusão de determinados segmentos da microcirculação, gerando uma heterogeneidade na distribuição do fluxo sanguíneo e hipóxia tecidual focal. Esse fenômeno, denominado de não-reperfusão (*no-reflow*), constitui em um mecanismo de lesão tecidual adicional decorrente da reoxigenação (Reffelmann e Kloner, 2003). Entre as hipóteses para a ocorrência desse fenômeno está a compressão do leito capilar pelas células endoteliais e epiteliais, edemaciadas durante a isquemia. Também se considera a ocorrência da oclusão dos capilares por trombos, aglomerados de leucócitos, plaquetas ou hemácias, hemoconcentração e desequilíbrio entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras decorrentes do processo inflamatório (Pinheiro et al., 1999).

Segundo o exposto, os eventos subseqüentes à hipóxia e reoxigenação são interdependentes e complementares e compreendem, em última análise, a uma resposta inflamatória tão intensa quanto maior o tempo de obstrução e o comprometimento circulatório decorrente. A

magnitude da reação inflamatória tecidual pode gerar uma inflamação generalizada caracterizando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocasionar a síndrome da falência de múltiplos órgãos (MODS) (Robertson e Coopersmith, 2006).

2.2. Mecanismos de lesão tecidual nas obstruções intestinais em eqüinos

Embora não se conheçam os mecanismos responsáveis pela lesão intestinal decorrente das obstruções em eqüinos, alguns eventos, em casos clínicos e experimentais, já foram documentados. Clinicamente, as obstruções estrangulativas cursam com maior gravidade de lesões de mucosa concomitante à maior produção de TNF- σ e menor taxa de sobrevivência (Morris et al., 1991). A principal fonte de TNF- σ são os leucócitos ativados e as células endoteliais sob hipóxia (Tab. 1). No entanto, a participação de neutrófilos na obstrução experimental em eqüinos possui resultados controversos.

Conforme já exposto, os neutrófilos podem gerar citocinas, RLO e liberar enzimas proteolíticas durante a resposta inflamatória. No cólon maior submetido à isquemia de baixo fluxo em eqüinos, observou-se infiltrado de neutrófilos após 3h isquemia com aumento após 30min de reperfusão, no entanto, sem atividade detectável de mieloperoxidase (MPO) (Moore et al., 1994). No cólon menor de eqüinos submetidos à OAV observou-se aumento moderado de neutrófilos durante a isquemia, sem aumentos significativos durante a reperfusão (Faleiros, 1997). No cólon menor sob DIL, o infiltrado aumentou após a reperfusão (Faleiros, 2003).

No jejuno de eqüinos submetido à isquemia venosa ou arterio-venosa sem reperfusão, não houve aumento no infiltrado de neutrófilos após 3h (Sullins et al., 1985). No entanto, em modelo de isquemia semelhante, observou-se infiltrado de neutrófilos após 70min de isquemia com aumentos significativos após 60min de reperfusão (Dabareiner et al., 2001). Rio Tinto (1999) e Abreu (2003) também verificaram aumento do infiltrado de neutrófilos em jejuno submetido a OV e OAV, especialmente após a reperfusão. Em modelos de distensão intraluminal de jejuno, observou-se aumento de

infiltrado de neutrófilos na serosa (Dabareiner et al., 2001).

Outro mecanismo de lesão são os RLO que podem ser gerados também pela ação da enzima XO durante a reoxigenação. Em eqüinos, ocorre a conversão da XDH em XO durante a isquemia, principalmente no intestino delgado e em quantidades mínimas no cólon maior (Prichard et al., 1991; Moore et al., 1995). No entanto, ao se quantificar o melandialdeído, um marcador de lipoperoxidação de membrana, os resultados encontrados levam ao questionamento da importância dos RLO formados durante a reperfusão. Após 90min de isquemia venosa no jejuno, houve aumento desse marcador sem aumento de seus níveis após 90min de reperfusão (Law e Freeman, 1995). Também houve aumento do melandialdeído no cólon maior de eqüinos após 3h de isquemia concomitante à diminuição dos mecanismos antioxidantes (Moore, 1997).

2.3. Lesões à distância decorrentes das obstruções intestinais

As lesões à distância decorrentes das obstruções intestinais são associadas à ocorrência da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Para que a SIRS ocorra, é necessária que a resposta inflamatória seja de tal magnitude que a quantidade de mediadores inflamatórios gerados seja capaz de produzir alterações em órgãos à distância, podendo predispor à síndrome da falência de múltiplos órgãos (MODS) (MacKay, 2003). Durante as obstruções intestinais ocorre a formação de diversos mediadores inflamatórios e RLO gerados conjuntamente pelas células endoteliais, leucócitos ativados e células epiteliais adjacentes à lesão que podem ser absorvidos via corrente circulatória ou linfática e predispor a SIRS (Robertson e Coopersmith, 2006). Adicionalmente, a destruição da barreira do epitélio intestinal cria condições para a passagem de endotoxinas ou translocação bacteriana em altas quantidades para o sistema circulatório. Tais toxinas também promovem a formação de mediadores inflamatórios que irão contribuir para a SIRS e MODS (Bellhorn e Macintire, 2004). Atualmente, por meio da biologia molecular, é possível compreender melhor o mecanismo fisiopatológico desses eventos.

A endotoxina, constituída quimicamente por lipopolissacarídeos (LPS), é um componente estrutural da membrana de bactérias gram-negativas, normalmente residentes e mantidas no lúmen intestinal pela barreira da mucosa constituída de células epiteliais e suas secreções, além da microbiota residente (Moore e Barton, 1998). Fisiologicamente, uma quantidade mínima de endotoxinas chega à circulação sanguínea, mas rapidamente é removida pelas células de Kupffer. No entanto, em situações de desequilíbrio da microbiota intestinal ou destruição das células epiteliais, como nos casos de isquemia e reperfusão (I/R) por obstrução estrangulativa no intestino, a quantidade de endotoxinas que atingem a circulação aumenta exponencialmente, gerando uma resposta inflamatória sistêmica (Moore e Barton, 1998).

Quando na corrente circulatória a endotoxina liga-se rapidamente a proteínas presentes no plasma chamadas de proteínas ligantes de LPS (LBP – *lipopolysaccharide binding protein*), sintetizadas pelo fígado, que possuem alta afinidade pela porção lipídica A da endotoxina. O complexo LBP-endotoxina liga-se ao receptor CD14, presente na membrana de monócitos, macrófagos e células de Kupffer (Moore e Barton, 1998). O CD14 também possui uma forma solúvel no plasma que igualmente liga-se ao complexo LBP-endotoxina para apresentá-lo a células que não possuem o CD14 em sua membrana, como as células endoteliais (Moore, 2003). Após a ligação do complexo LBP-endotoxina ao receptor CD14, inicia-se uma seqüência de eventos de sinalização intracelular transmitidos por receptores chamados de TLR (*Toll-like receptor*), dos quais o TLR-4 é o mais estudado em caso de endotoxemia (Johnson et al., 2004). Esses receptores, envolvidos nos eventos gerados pela endotoxemia, também o são na SIRS e na MODS (Bryant, 2003).

Os TLR são receptores de membrana existentes em macrófagos, neutrófilos e células epiteliais do intestino e pulmão, capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos como os lipopolissacarídeos (LPS). Ao reconhecer esses padrões, o TLR liga-se a eles por meio das proteínas CD14 e MD2, também presentes na superfície celular (MacKay, 2003). Após a ligação, ocorre a ativação de uma via de sinalização intracelular que, via proteínas-quinase como a IRAK-4 (*interleucin-4 receptor*

associated kinase), realiza a fosforilação do chamado IKB (fator de inibição kappa beta) que ativa o fator nuclear kappa beta (NF- κ B). Após a ativação do NF- κ B, este migra para o núcleo onde será responsável pela ativação de uma seqüência de genes que codificam alguns mediadores inflamatórios, entre os quais estão o TNF- σ , a COX-2, as interleucinas, a lisofosfatidilcolina, o PAF e fatores de coagulação e fibrinólise (Moore e Barton, 1998; Moore, 2003). O TLR-4, também induz a produção de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (Bryant, 2003). Portanto, após a ativação da via de sinalização gerada pela ligação no receptor TLR4, ocorre a síntese de mediadores e ativação de células inflamatórias, alteração da permeabilidade vascular e formação de RLO (Robertson e Cooper-Smith, 2006).

O mecanismo supracitado refere-se ao sistema imune inato. O sistema imune adaptativo interage e se integra ao inato, o que ocorre por meio das citocinas liberadas após a ativação do TLR-4. Essas citocinas irão atuar em células dendríticas que irão se ligar a antígenos e ativar os linfócitos T e B. As células T, depois de ativadas, irão gerar mais citocinas, aumentando ainda mais a resposta inflamatória.

A SIRS pode desencadear a MODS por meio da resposta inflamatória gerada e os subprodutos da degranulação de leucócitos. Adicionalmente, as lesões remotas e a MODS têm sido associadas à ocorrência de morte celular por apoptose mediada pelas citocinas e RLO gerados na SIRS (Papathanassoglou et al., 2000).

A apoptose mediada pelas citocinas está relacionada especialmente ao TNF- σ que dispõe de receptores de apoptose em várias células do organismo. Os receptores que se ligam ao TNF- σ para indução da apoptose chamam-se *Fas*. Após a ligação ao receptor, inicia-se uma seqüência de sinalização intracelular que ativa uma série de proteínas. A caspase 8, quando ativada, ativa outras caspases e realiza a clivagem de uma proteína chamada *Bid*, da família BCL-2. A *Bid* ativada direciona-se à membrana mitocondrial rompendo-a e liberando o citocromo C. Esse, após liberado no citosol, irá ligar-se à moléculas pró-apoptóticas formando o complexo citocromo C/apaf-1/Caspase 9. Esse complexo inicia a ativação de outras caspases que culminam com a apoptose (Papathanassoglou et al., 2000).

A indução da apoptose a partir dos RLO pode ocorrer a partir de sua ação na peroxidação de fosfolipídeos de membrana. Os RLO destroem a membrana plasmática e também a mitocondrial, liberando, assim, o citocromo C para o citosol, o qual irá ativar a apoptose via formação do complexo citocromo C/Apaf-1/Caspase 9, conforme anteriormente descrito (Cooper, 2000b).

Adicionalmente, considera-se outra possível via para a ocorrência da apoptose no desenvolvimento de lesões remotas e MODS. Nas células onde o receptor *Fas* está presente, pode haver liberação desse receptor para a corrente circulatória formando a chamada *FasL* solúvel. Essa liberação ocorre pela ação de metaloproteinases durante o processo inflamatório e pode constituir uma via de ação parácrina, uma vez que a *FasL* solúvel também é capaz de induzir apoptose à distância (Papathanassoglou et al., 2000).

O órgão mais frequentemente afetado em decorrência da SIRS e das alterações circulatórias no intestino é o pulmão (Nakagawa et al., 2008). Esse órgão é rico em receptores TLR e, além da possibilidade de desenvolvimento de lesão pela via hematogênica, é o primeiro a ser exposto à linfa mesentérica, a qual pode conter citocinas e endotoxinas produzidas durante a I/R intestinal (Bellhorn e Macintire, 2004). Em condições experimentais, verificou-se que sofre aumento de permeabilidade vascular e da concentração de MPO após 30 minutos de reperfusão intestinal (Souza et al., 2000). Em equinos, a lesão pulmonar foi documentada 12h após a distensão intraluminal experimental de cólon menor com a presença de neutrófilos no parênquima pulmonar e aumento de MPO (Faleiros et al., 2008). As alterações em equinos, bem como em outras espécies estudadas foram atribuídas, especialmente, aos mediadores inflamatórios gerados pela I/R intestinal, entre os quais se destacam o TNF- σ , LTB₄ e PAF (Souza et al., 2000; MacKay, 2003; Faleiros et al., 2008).

A laminite é uma alteração frequentemente associada à afecções intestinais em equinos, podendo ter uma prevalência de até 25% em cólicas de ocorrência natural (Belknap e Moore, 1989; Cohen et al., 1994). No entanto, a fisiopatologia ainda é controversa, mas

atualmente, é atribuída especialmente à ativação das metaloproteinases do tecido laminar pelas citocinas geradas durante o processo inflamatório intestinal (Politt, 2007).

2.4. Terapêutica das lesões de isquemia e reperfusão

Devido à complexidade da fisiopatologia da isquemia e reperfusão, recomenda-se o uso de fármacos com várias ações terapêuticas ou, então, a terapia multimodal, a qual é constituída de agentes que atuam em diferentes mecanismos do complexo fisiopatológico (Rowe e White, 2006). O tratamento deve objetivar a preservação da integridade celular e reduzir a formação de RLO, o acúmulo e migração de neutrófilos e a inflamação (White, 2006).

Alguns agentes com propriedades de inibir a formação ou neutralizar os RLO, como o alopurinol e a superóxido desmutase, quando utilizados isoladamente, foram ineficientes para atenuar as lesões decorrentes de I/R em equinos (Horne et al., 1994; Johnston et al., 1991). No entanto, o alopurinol, em associação com outras substâncias constituintes de uma solução utilizada em transplantes chamada de “Carolina Rinse”, auxiliou na atenuação de lesões decorrentes de I/R intestinal (Young et al., 2002).

A solução de “Carolina Rinse” é constituída de antioxidantes (alopurinol, glutatona e desferroxamina), substratos de ATP (glicose e frutose), bloqueador de canais de cálcio (nicarbidina) e vasodilatador (adenosina) em pH 6,5. Recentemente, seu uso em isquemia de baixo fluxo no jejuno de equinos atenuou as lesões circulatórias e o infiltrado de neutrófilos (Van Hoogmoed et al., 2001; Van Hoogmoed et al., 2002). No entanto, foi parcialmente efetiva no jejuno submetido à distensão (Young et al., 2002) e não pode ser administrada sistemicamente, o que limita seu uso em lesões intestinais extensas (White, 2006).

O dimetil sulfóxido (DMSO) é um antiinflamatório com ação de neutralização de radicais superóxido, estabilização de membranas lisossomais, inibição da quimiotaxia de neutrófilos, da agregação plaquetária e da proliferação de fibroblastos (Brayton, 1986). Apesar de ser empregado amplamente em equinos com cólica (Moore e Bertone, 1992), o

DMSO possui resultados controversos e limitados quando avaliado experimentalmente em casos de I/R em eqüinos. Na dose comumente utilizada, 1g/Kg/IV, possui meia vida biológica de até 9h (Plumb, 2002). Nessa mesma dose, em modelo experimental de isquemia arteriovenosa de jejuno, não atenuou a lesão de mucosa (Arden et al., 1990; Horne et al., 1994). No entanto, recentemente, a administração de 20mg/Kg diminuiu a ocorrência de aderência pós-operatória em potros submetidos a isquemia arteriovenosa em jejuno e íleo (Sullins et al., 2004) e atenuou danos à microvasculatura, além de diminuir o infiltrado de neutrófilos no jejuno submetido à isquemia de baixo fluxo (Dabarainer et al., 2005). No entanto, nesse último modelo, as alterações de mucosa foram ausentes, ocorrendo, apenas, alterações vasculares, motivo pelo qual os autores sugeriram a avaliação da dose utilizada em modelos de isquemia completa, onde os danos ao intestino são mais acentuados (Dabarainer et al., 2005).

A pentoxifilina (PTX) é um derivado da metilxantina que possui propriedades hemorreológicas caracterizadas por melhorar o fluxo sanguíneo e a deformidade eritrocitária, inibir a agregação plaquetária e reduzir a viscosidade do sangue em condições patológicas (Abreu, 2003). Em situações experimentais, verificou-se que a PTX inibe a XO, neutraliza os radicais superóxido e hidroxila e a atividade da PLA₂, o que resultou em diminuição do infiltrado de neutrófilos e da produção de TNF- σ (Mandel, 1995). Adicionalmente, constatou-se que a PTX induz a formação endógena de prostanglandina E₂ (PGE₂), para a qual se atribuiu a sua ação citoprotetora (Aslan et al., 2001). Em eqüinos, a meia vida biológica da PTX é variável (Plumb, 2002), mas em modelos de obstrução venosa de jejuno na espécie, esse agente atenuou a hemorragia de mucosa e o edema de submucosa e resultou na recuperação mais precoce da mucosa após 12h de reperfusão (Abreu, 2003).

O succinato sódico de hidrocortisona (SSH) é um glicocorticóide de rápido início de ação e meia-vida biológica de aproximadamente 12h, sendo 30 vezes mais potente que a dexametasona (Plumb, 2002). Em modelos de isquemia arteriovenosa e venosa de jejuno em eqüinos, colaborou para o reparo mais precoce da mucosa, mas não reduziu a hemorragia e o infiltrado de

neutrófilos na mucosa e submucosa e o edema de submucosa (Rio Tinto, 1999). No entanto, em modelo de distensão de cólon maior, o SSH reduziu a hemorragia, o infiltrado de neutrófilos e o edema de serosa durante a reperfusão (Faleiros, 2003).

O ácido ascórbico (AA) é uma substância envolvida no reparo de muitos tecidos e na formação do colágeno, além da manutenção da integridade vascular e da função imune (Plumb, 2002). Também é um neutralizador de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, auxiliando na preservação das concentrações intracelulares de glutatona (Lee et al., 2006). Em suínos, o AA melhorou a hemodinâmica e diminuiu o estresse oxidativo, a inflamação e a fibrose após isquemia renal (Chade et al., 2003). Em modelos de isquemia e reperfusão intestinal em coelhos, o AA atenuou o edema e a hemorragia das camadas submucosa e muscular (Byrka-Owczarek et al., 2004). Em eqüinos, após a administração intravenosa, o AA possui ampla distribuição sistêmica e uma meia vida biológica é de até 17h (Löscher et al., 1984). Na literatura consultada não foram encontrados estudos avaliando seus efeitos em eqüinos portadores de I/R intestinal.

Recentemente, a glutamina tem sido utilizada em situações experimentais em cobaias e em condições clínicas em humanos com resultados satisfatórios na atenuação e recuperação de lesões intestinais devido às suas várias ações terapêuticas. A glutamina é um aminoácido presente em altas concentrações no sangue e nas células musculares e intestinais, sendo a principal fonte energética para enterócitos (Lopes-Paulo, 2005; Thomas et al., 2005). A glutamina também participa do crescimento e atividade de fibroblastos e linfócitos e modula a resposta das células intestinais no estresse oxidativo e na inflamação, além de inibir a apoptose induzida pelo TNF- σ em enterócitos (Fuchs e Bode, 2006). Em pacientes portadores de afecções graves, as concentrações de glutamina na circulação diminuem devido ao aumento da demanda desse nutriente pelos tecidos. Nesses pacientes, a diminuição da glutamina possui uma correlação positiva com a mortalidade, sendo sua suplementação benéfica, o que a torna um aminoácido essencial nesses casos (Lopes-Paulo, 2005). A suplementação de glutamina foi eficaz na restauração da mucosa

intestinal e na cicatrização cutânea em humanos portadores de queimaduras e, em condições experimentais, na lesão e reperfusão intestinal, hepática e periférica em ratos (Harward et al., 1994; Peng et al., 2004; Jia et al., 2006; Omata et al., 2007; Murphy et al., 2007; Szijártó et al., 2007). Em equinos, é utilizada como suplemento nutricional para atletas (Harris et al., 2006). Não foi encontrada, na literatura consultada, referência de seu uso em animais portadores de afecções intestinais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e anestesia

O presente experimento teve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com protocolo de número nº144/2004.

O experimento foi realizado em parceria entre a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFGM) e o Equicentro da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG) - Campus Betim. Foram utilizados 18 equinos, sem raça definida, com idade entre 4 e 12 anos, peso corporal médio de $297,4 \pm 32,4$ Kg e escore entre 3 e 4 (escala de 1 a 5, segundo Spiers, 1995). Os animais foram vermifugados e alimentados por 15 dias com feno à vontade e, anterior à cirurgia, pesados e avaliados por meio de exames clínicos e laboratoriais constituído de hemograma completo.

Após jejum de 12h, os equinos receberam 6,6mg/Kg/IV de gentamicina¹ e 20.000UI/Kg/IM de penicilina procaína² e foram posteriormente pré-medicados com midazolam³ (0,15mg/kg/IV) e éter gliceril guaiacol⁴ (100mg/kg/IV). Após o decúbito lateral, os animais foram intubados pelo método de rotina. A indução e manutenção anestésicas foram feitas com isofluorano⁵ volatilizado em 15mL/kg/min de oxigênio via

sonda orotraqueal através de aparelho de anestesia, com vaporizador compensado em circuito semifechado.

Como fluidoterapia durante o trans-cirúrgico utilizou-se a solução de ringer lactato em velocidade de infusão de 10mL/Kg/h, sendo aumentada para 12,5mL/Kg/h durante o período do tratamento, que iniciou ao final de 1h de isquemia e durou até o início da reperfusão. A pressão arterial média foi avaliada pelo método invasivo com catéter na artéria facial e mantida entre 70 e 100mmHg, sendo realizada a administração de dobutamina⁶ (1 a 5mcg/kg/min) diluída em solução de ringer lactato, quando necessário. A concentração de CO₂ ao final da expiração (ETCO₂) foi avaliada por capnografia e mantida entre 35 e 50mmHg por respiração controlada.

3.2. Lesão experimental

Sob anestesia geral, foi procedida uma celiotomia mediana pré-umbilical de aproximadamente 40cm, por onde foi feita a exposição do jejuno, onde foram demarcados dois segmentos de 40cm cada. O primeiro submetido à modelo de obstrução com isquemia venosa completa (IVC), localizava-se a um metro, em sentido oral, do início da prega íleo cecal. O segundo, submetido à modelo de obstrução com distensão intraluminal (DIL), situava-se um metro distante do primeiro, também em sentido oral.

Para instrumentar a IVC no jejuno, foram realizadas ligaduras murais nas extremidades dos segmentos demarcados, utilizando-se drenos de penrose nº 3 envolvendo externamente toda a circunferência intestinal, com o propósito de ocluir a irrigação mural e os vasos paralelos à borda mesentérica. Realizaram-se também ligaduras nos ramos das veias mesentéricas, utilizando-se drenos de penrose nº 1 (Rito Tinto, 1999). Após a instrumentação, a circulação arterial adjacente às ligaduras foi avaliada por meio de dopplerimetria para assegurar-se de sua presença após o preparo do segmento.

Para o segundo modelo, a DIL foi realizada infusão intraluminal de solução de NaCl 0,9% aquecida a 37°C em um segmento isolado por

¹ Gentocin. Shering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio Ltda. Cotia, SP.

² Despacilina 400.000UI. Bristol Myers Squibb S.A. São Paulo, SP.

³ Dormire. Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP.

⁴ Éter Gliceril Guaiacol. Farnos Comércio e Indústria Ltda. Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Florane. Laboratório Abbott. Rio de Janeiro, RJ.

⁶ Dobutrex. Hipolabor Farmacêutica. Belo Horizonte, MG.

ligaduras completas murais, como anteriormente descrito. A solução foi injetada via sonda uretral nº 8, introduzida no lúmen através de enterotomia em segmento adjacente. A sonda foi acoplada externamente a um frasco com solução de NaCl 0,9% e a um manômetro aneróide por meio de uma torneira de três vias. A pressão no lúmen intestinal foi mantida em 25cmH₂O por todo o período de obstrução (Dabareiner et al., 2001).

Após a instrumentação, os segmentos experimentais do jejuno foram mantidos obstruídos por 2h quando as ligaduras e sondas foram retiradas e os animais mantidos em anestesia durante as 2h iniciais de reperfusão desses segmentos. Durante todo o período de obstrução e reperfusão, os segmentos foram mantidos dentro do abdômen. Após esse tempo, a anestesia foi interrompida e a recuperação anestésica foi permitida.

Imediatamente ao final da anestesia, os animais receberam 0,05mg/kg/IV de butorfanol¹ a cada 4h, com intuito de manter a analgesia. Após a recuperação anestésica até o período de 12h de reperfusão, os equínos foram mantidos em baias desprovidas de cama, em jejum hídrico e alimentar. Doze horas após a desobstrução intestinal, os animais foram sedados com xilazina² (1mg/kg/IV) e acepromazina³ (0,1mg/kg/IV), e induzidos à anestesia geral com tiopental⁴ (3mg/kg/IV), procedendo-se, então, a eutanásia por infusão intravenosa de solução saturada de sulfato de magnésio.

3.3. Grupos experimentais

Os 18 equínos foram distribuídos ao acaso em três grupos experimentais – controle (C), glutamina⁵ (T1) e multimodal (T2) constituído pela associação de succinato sódico de hidrocortisona⁶, pentoxifilina⁷, ácido ascórbico⁸ e

¹ Torbugesic. Fort Dodge Saúde Animal. Campinas, SP.

² Sedazine. Fort Dodge Saúde Animal. Campinas, SP

³ Acepran 1%. Univet S/A Indústria Veterinária. São Paulo, SP.

⁴ Thiopentax. Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP.

⁵ L-Glutamina. Galena Química e Farmacêutica Ltda. Campinas, SP.

⁶ Androcortil 500mg. Teuto Brasileiro S/A. Anápolis, GO.

⁷ Pentox 100mg/5mL. Farmasa Laboratório Americano Farmacoterapia S.A. São Paulo, SP.

⁸ Monovin C. Laboratório Bravet Ltda. Rio de Janeiro, RJ.

dimetilsulfóxido⁹ - conforme a Tab.2. Os tratamentos foram realizados por via IV após 1h de isquemia (1º tratamento) e 6h de reperfusão (2º tratamento) (Fig. 2).

O 1º tratamento dos equínos do grupo C foi a solução ringer lactato na taxa de infusão de 12,5mL/Kg/h, sendo essa mesma velocidade utilizada no grupo T1 para a administração de glutamina após sua diluição (Tab. 2), enquanto que no grupo T2, todos os fármacos foram co-administrados, em bolus, na seguinte ordem: succinato sódico de hidrocortisona (SSH), pentoxifilina (PTX), ácido ascórbico (AA) e dimetilsulfóxido (DMSO) diluído em 100mL de solução salina. Tais fármacos foram aplicados nos primeiros 15min após o início do 1º tratamento, sendo que no restante do tempo, ou seja, até o final da isquemia, foi administrado ringer com lactato na taxa de 12,5mL/Kg/h (Tab. 2). O 2º tratamento dos grupos C e T2 foi a infusão de ringer com lactato na taxa de 12,5mL/Kg e do grupo T1 foi a glutamina na mesma velocidade de infusão.

3.4. Colheita e processamento das amostras

Foram colhidas amostras de tecido intestinal nos segmentos experimentais antes (tempo zero) e ao final da obstrução (2h de isquemia) e após duas e 12h de reperfusão. Essas amostras eram constituídas de fragmentos com aproximadamente 2x5cm, colhidos na borda anti-mesentérica, por meio de secção transversal com o bisturi incidindo todas as camadas. Após remoção de cada fragmento, a ferida foi suturada com categute 2-0, em padrão simples contínuo seguido de sutura invaginante em padrão Cushing.

Após a eutanásia dos animais foram colhidas amostras de tecido intestinal correspondentes a 12h de reperfusão e, em áreas distantes no mínimo 30cm aos segmentos demarcados, correspondendo aos segmentos à distância da lesão. Nesse mesmo tempo foram colhidas também amostras de fígado, pâncreas, miocárdio, pulmão, rim e cório laminar digital de ambos os membros torácicos.

⁹ Dimesol. Marcolab Indústria de Produtos Veterinários. Duque de Caxias, RJ.

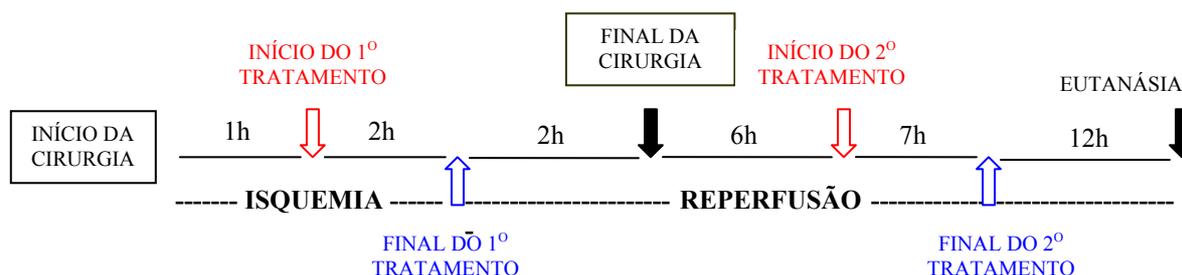


Figura 2. Períodos de isquemia e reperfusão e tratamentos realizados em 18 equínos submetidos a duas horas de isquemia por distensão intraluminal e isquemia venosa completa de jejuno seguida de 12 horas de reperfusão.

Tabela 2. Grupos experimentais e tratamentos em 18 equínos submetidos a duas horas isquemia por distensão intraluminal e isquemia venosa completa de jejuno seguida de 12 horas de reperfusão

Grupo experimental	Tratamentos	
	1º Tratamento (após 1h de isquemia)	2º Tratamento (após 6h de reperfusão)
Controle (C)	Solução ringer lactato 12,5mL/Kg/h	Solução ringer lactato 12,5mL/Kg/h
Glutamina (T1)	25mg/Kg em solução ringer lactato a 2% em infusão de 12,5mL/Kg/h	25mg/Kg em solução de ringer lactato a 2% em infusão de 12,5mL/Kg/h
Multimodal (T2)	- Succinato sódico de hidrocortisona - 4mg/Kg/IV em bolus; - Pentoxifilina - 8 mg/kg/IV em bolus; - Ácido ascórbico - 50mg/kg/IV em bolus; - Dimetilsulfóxido - 20mg/Kg/IV diluído em 100mL de NaCl 0,9% em bolus; - Solução ringer lactato 12,5mL/Kg/h	- Solução ringer lactato 12,5mL/Kg/h

As amostras de tecido intestinal foram divididas em três fragmentos. O primeiro foi imediatamente fixado em solução de formalina tamponada a 10% e, posteriormente, processado segundo técnicas rotineiras de inclusão em parafina, cortadas em micrótomo a 5µm, coradas pela hematoxilina e eosina e examinadas em microscópio de luz para análise histológica. O segundo fragmento foi fixado em solução de glutaraldeído tamponado e armazenado a 4°C, para posterior processamento de rotina para microscopia eletrônica de varredura. O terceiro fragmento foi acondicionado em tubos criogênicos e imediatamente congelado por imersão em nitrogênio líquido para as análises dos mediadores inflamatórios e da atividade de mieloperoxidase. Os fragmentos de fígado, pâncreas, miocárdio, pulmão, rim e cório laminar digital foram divididos em duas frações, uma conservada em formalina tamponada a 10% para posterior análise histopatológica e outra congelada em nitrogênio líquido, conforme descrito para os segmentos de intestino, para análise da atividade de mieloperoxidase.

3.5. Análises histológicas

As análises histológicas do tecido intestinal foram realizadas por um único examinador sem o conhecimento do segmento avaliado. Foram utilizados como parâmetros semi-quantitativos os escores para erosão, edema, hemorragia e infiltrado de neutrófilos na mucosa, submucosa, muscular e serosa, segundo sistema adotado por Rio Tinto (1999), os quais se encontram nas Tabs. 3 e 4. Na serosa também foram utilizados escores para descamação de células mesoteliais, distensão de linfáticos e deposição de fibrina, com base em método adotado por Debareiner et al. (2001), demonstrado nas Tabs. 5 e 6. A avaliação dos demais órgãos foi realizada também sem que o examinador tivesse conhecimento do grupo correspondente à amostra sendo anotadas quaisquer alterações. A avaliação do tecido laminar foi realizada com base no critério seguido por Rio Tinto (1999) (Tab. 7).

Tabela 3. Escore para erosão de mucosa do jejuno de equínos submetidos a isquemia e reperfusão por distensão intraluminal e isquemia venosa completa.

Escore	Lesão
0	Ausente
1	Separação entre o epitélio e a lâmina própria na extremidade das vilosidades
2	Exposição da lâmina própria na extremidade das vilosidades
3	Exposição da lâmina própria de um terço até a metade da extensão das vilosidades
4	Exposição da lâmina própria até a base das vilosidades
5	Destruição das vilosidades

Adaptado de Rio Tinto (1999).

Tabela 4. Escore para edema, hemorragia e presença neutrófilos polimorfonucleares nas camadas intestinais do jejuno de equínos submetidos à isquemia e reperfusão por distensão intraluminal e isquemia venosa completa.

Escore	Edema/Hemorragia/Neutrófilos polimorfonucleares
0	Ausente
1	Incipiente
2	Leve
3	Moderado
4	Intenso

Adaptado de Rio Tinto (1999).

Tabela 5. Escore para dilatação de vasos linfáticos e desprendimento de células mesoteliais na serosa do jejuno de equínos submetidos a isquemia e reperfusão por modelo de distensão intraluminal do jejuno e isquemia venosa completa de jejuno.

Escore	Dilatação de linfáticos	Desprendimento de células mesoteliais
0	Normal	Ausente
1	Moderada	Moderado
2	Intensa	Intenso

Adaptado de Debareiner et al. (2001).

Tabela 6. Escore para deposição de fibrina na serosa do jejuno de equínos submetidos à isquemia e reperfusão por modelo de distensão intraluminal do jejuno e isquemia venosa completa de jejuno.

Escore	Deposição de fibrina
0	Ausente
1	Discreto
2	Moderado
3	Intenso

Adaptado de Debareiner et al. (2001).

Tabela 7. Escores para lesão de tecido laminar nos dígitos torácicos em 18 equínos submetidos a isquemia e reperfusão por obstrução venosa completa e distensão intraluminal de jejuno.

Escore	Lesão
0	Ausente
1	Presença de lesão na base das Lep ¹ . Estreitamento das Les ² . Núcleos das células basais arredondados e próximos à membrana basal. Individualização das Les difícil.
2	Presença de lesão apenas até o nível médio das Lep. Ausência de Lds ³ entre as Les.
3	Estreitamento na extremidade das Lep. Ao nível médio das Lep as Les formam uma massa amorfa de tecido entre as Lep e as Ldp ⁴ .

¹Lep: lâminas epidérmicas primárias; ²Les: lâminas epidérmicas secundárias; ³Lds: lâminas dérmicas secundárias;

⁴Ldp: lâminas dérmicas primárias. Adaptado de Rio Tinto (1999)

3.6. Análise ultra-estrutural e mensuração da área, perímetro e número de vilosidades por mm²

As análises ultra-estruturais das amostras intestinais armazenadas em glutaraldeído foram realizadas mediante o corte de fragmentos de aproximadamente 16mm² das amostras intestinais. Esses fragmentos foram tratados com tetróxido de ósmio a 2% por 2h e, posteriormente, desidratados por passagens consecutivas de 15min em concentrações crescentes de álcool etílico. Após secagem em CO₂ sob pressão, por meio de secador de ponto crítico, os fragmentos foram metalizados em metalizador de fluxo iônico por período de 70s em potência de 70mA. A mucosa das amostras intestinais foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura, operando em 15kV em um aumento de 150 vezes. As amostras foram fotografadas e analisadas para avaliação de possíveis alterações morfológicas.

A mensuração da área, perímetro e número de vilosidades por mm² das vilosidades foi realizada nos segmentos de jejuno submetidos à distensão intraluminal. Após digitalizadas, as imagens obtidas pela análise de microscopia eletrônica de varredura foram analisadas por meio de um software de processamento e análise de imagens de domínio público (Image J, National Institute of Mental Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Após a calibração do cursor, ao se estabelecer a escala de número de pixels para µm, foram registrados o diâmetro e o perímetro do ápice da cada uma das vilosidades intestinais. O valor de cada amostra foi considerado como o valor médio das vilosidades medidas.

Para se estabelecer o número de vilosidades por mm², realizou-se a determinação da área digitalizada nas diversas amostras, sendo considerados na contagem todos os ápices das vilosidades que apareciam por inteiro. Em todos os animais, estabeleceu-se que seriam também incluídos nessa contagem todos os ápices incompletos que se apresentavam junto às margens superior e esquerda, sendo desconsiderados aqueles que estavam junto às margens inferior e direita.

3.7. Determinação da atividade de mieloperoxidase

A determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) foi realizada nas dependências e de acordo com protocolos do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e descrito por Souza et al. (2000). A atividade de mieloperoxidase (MPO) foi realizada em todos os tecidos colhidos. No jejuno submetido a DIL, a MPO foi avaliada nas camadas serosa e muscular e mucosa e submucosa separadamente.

Após descongelados, 100mg de tecido foram triturados, homogeneizados em 1,9 mL de solução tampão com pH 4,7 (0,1M de NaCl, 0,02M de NaPO₄, e 0,015M de NaEDTA) e centrifugados a 260 x g por 10 min. Após a retirada do sobrenadante, foi procedida a lise hipotônica, com 1,5 mL de solução de NaCl a 0,2% por 30s, seguida pela adição de solução com 1,6% de NaCl e 5% de glicose. Após nova centrifugação, foram realizadas ressuspensão e homogeneização com tampão de NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de bromido de hexadecil-trimetil-amonia. Aliquotas de 1mL dessa solução foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido. Após centrifugação por mais 10 min. (10.000 x g), retirada do sobrenadante e ressuspensão em 1mL, determinou-se a atividade da MPO medindo-se a mudança na densidade óptica a 450nm usando-se tetrametilbenzidina (1,6mM) e peróxido de hidrogênio (0,5mM).

3.8. Reação de transcrição da polimerase reversa em cadeia em tempo real (RT-PCR)

As amostras para análise da expressão de TNF-σ e GCP-2 foram processadas no Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG. Os primers de cada mediador foram delineados para a espécie equina com base nas seqüências de mRNA disponíveis no *Gen bank* por meio do programa “Primer3” de domínio público (<http://frodo.wi.mit.edu/>), com números de acesso AB035735 (TNF-σ), AF035774 (βactina) e MM001081886 (GCP-2) e estão expostos na Tab. 8. As análises foram realizadas nas amostras do grupo controle do jejuno submetido à DIL e a IVC.

Tabela 8. Sequência gênica dos primers da espécie equina utilizados para quantificar o TNF- σ e GCP-2 (CXCL6) por PCR em tempo real em equinos com obstrução intestinal.

Gene	Primer
TNF- σ	5'-GGT TGT CTG TCA GCT TCA CG - 3' 5' -AGA CCA TGT TGT AGC AAA CC- 3'
GCP-2	5' -TCC AAG GTG GAA GTC GTA CC- 3' 5' -GTT TTT CAA TGC GTG GTC CT- 3'

Fonte: <http://frodo.wi.mit.edu/>

Para a extração do RNA, os fragmentos preservados a -80°C foram triturados em placas de Petri com o reagente Trizol¹, transferidos para um eppendorf e homogeneizados com 0,7mL de Trizol. Após incubação em temperatura ambiente por 5min, foi adicionado 200 μ l de clorofórmio, seguindo-se agitação manual por 15seg e incubação em temperatura ambiente por 2 a 3min. Para a separação das fases, centrifugou-se o homogeneizado em centrífuga a 12,000 x g por 15min. a temperatura de 2 a 8°C e o sobrenadante foi transferido para um eppendorf, onde acrescentou-se 500 μ l de álcool isopropílico para posterior incubação por 10min. em temperatura ambiente e precipitação do RNA. Após remoção do sobrenadante, 1mL de etanol 75% foi adicionado ao pellet de RNA, homogeneizado e centrifugado a uma rotação não superior 7,500 x g por 5min. à temperatura de 2 a 8°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi dissolvido em água livre de RNase¹, incubado por 10min. à temperatura de 55-60°C e acondicionado em freezer a -20°C para posterior síntese do cDNA.

Para a síntese de cDNA foram mensuradas as quantidades de RNA (ng/ μ l) de cada amostra para definir o volume necessário para que se obtivesse de cada uma um total de 500ng/ μ l de RNA. Após definido o volume de cada amostra, foram acrescentados os reagentes RT Reaction Mix (5 μ l), RT Enzyme Mix (1 μ l) e água livre de RNase em quantidade suficiente para completar 10 μ l. Essa solução foi agitada e incubada seqüencialmente a 25°C por 10min, a 42°C por 50min. e a 85°C por 5min.

Para o PCR em tempo real, foram utilizados 2,5 μ l de cDNA; 12,5 μ l de reagente Syber Green Mix (Invitrogen); 0,5 μ l de ambos os primers de cada mediador (Tab. 8). O RT-PCR foi realizado utilizando-se termociclador de PCR em tempo real Smart Cycler II (Cepheid) com a seqüência

de 2min em 50°C, 10min em 95°C e 40 ciclos de 15seg a 95°C e 1min a 60°C.

A variação relativa da quantidade de mRNA foi calculada com base nos valores de Ct (Cycle threshold), conforme descrito por Livak e Schmittgem (2001). Os valores representam a variação dos tratamentos em relação ao controle após normalização com base na expressão de β actina. A especificidade de amplificação foi determinada avaliando-se os valores de Tm (temperatura de fusão) dos amplicons (Anexo 2).

3.9. Tratamento estatístico dos dados

Foram realizadas comparações entre os grupos tratados e entre os tempos de cada grupo. As avaliações estatísticas paramétricas foram feitas através de análise de variância em blocos ao acaso e submetidas ao teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre tempos de um mesmo grupo. O teste t de Student foi utilizado para comparação entre grupos em cada tempo. Os dados não paramétricos foram analisados segundo o teste de Friedman para tempos em um mesmo grupo e o teste Mann-Whitney para grupos em um mesmo tempo (Sampaio, 1998) com nível de significância de $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Anestesia

O protocolo de anestesia utilizado permitiu a intubação e indução sem excitação dos animais com padrões hemodinâmicos e respiratórios estáveis no início do procedimento até o final da fase de isquemia. No entanto, em todos os animais houve queda da pressão arterial nos primeiros minutos após a desobstrução intestinal, sendo necessária a infusão de dobutamina até o final da cirurgia. Três animais tiveram que ser substituídos, pois, mesmo com a infusão de dobutamina, não se conseguiu elevar a pressão arterial acima de 70mmHg.

¹ Invitrogen Corporation. www.invitrogen.com

4.2. Alterações macroscópicas

No segmento submetido à DIL as alterações observadas foram discretas e mais visíveis ao final da isquemia. A serosa adquiriu uma coloração avermelhada e os vasos ficaram mais evidentes (Fig. 3A). Minutos após a desobstrução essas alterações passaram a não ser visualizadas e o aspecto da serosa e vasos tornou-se semelhante ao segmento controle. Não foi observada alteração na espessura das camadas intestinais e a hemorragia à secção durante a colheita das amostras foi considerada normal.

Durante o período de obstrução do segmento sob DIL, a pressão intraluminal era continuamente avaliada e mantida por um auxiliar responsável apenas por essa função. A reposição de solução de NaCl 0,9% intraluminal era realizada com mais frequência quanto mais prolongado era o tempo de obstrução. Após a instrumentação do segmento sob DIL, durante o período isquêmico, eram gastos aproximadamente de 500 a 700mL de solução de NaCl 0,9% para a manutenção da pressão em 25mmH₂O.

As alterações no jejuno submetido a IVC foram evidentes ao final da obstrução. A serosa e a mucosa adquiriram uma coloração vermelho escura e houve aumento de espessura do órgão (Fig. 3B), com hemorragia intensa durante a secção para colheita das amostras e edema de mucosa e submucosa. Houve distensão das veias e artérias jejunais e suas ramificações e hemorragia acentuada na serosa e mesentério (Fig. 3C). Após 2h de reperfusão, não se observou diminuição visível da espessura e edema da mucosa e a serosa adquiriu um aspecto brilhante, característico de edema. Após 12h de reperfusão, a coloração da serosa e mucosa estava vermelho escuro, porém em menor intensidade da observada às 2h de reperfusão e a espessura, embora diminuída, estava maior que nos segmentos adjacentes.

4.3. Análise histopatológica

4.3.1. Amostras intestinais

A quantidade de lesões foi menor no jejuno sob DIL e maior no segmento submetido à IVC. Nesse, as alterações abrangeram um maior

número de camadas e no jejuno sob DIL as alterações significativas foram encontradas apenas na serosa (Tab. 9 e 10).

No jejuno sob IVC, a erosão de mucosa ocorreu após 2h de isquemia sem diferença entre grupos até 12h de reperfusão e, na avaliação da progressão dessa alteração ao longo do tempo dentro de cada grupo, houve diminuição significativa após 12h de reperfusão nos grupos glutamina (T1) e multimodal (T2) (Tab. 9 e Fig. 4A). A hemorragia foi a alteração que atingiu o maior número de camadas, especialmente a mucosa e submucosa, com aumento após 2h de isquemia em todos os grupos (Figs. 4B, 5A, 5B e 6). Na avaliação dessa alteração ao longo do tempo de cada grupo, em T1 e T2 onde houve diminuição significativa na hemorragia de mucosa após 2h de reperfusão (Fig. 4B).

O infiltrado de neutrófilos foi significativo na serosa de todos os grupos após 2h de reperfusão e, no T1 e T2, também na muscular após 2h de isquemia. Em todas as situações o infiltrado manteve-se elevado até as 12h de reperfusão (Figs. 7 e 8). O edema foi significativo apenas na submucosa em todos os grupos após 2h de isquemia, permanecendo assim até as 12h de reperfusão (Fig. 9). Na serosa também ocorreu desprendimento de células mesoteliais em todos os grupos após 2h de isquemia e a distensão de vasos linfáticos após 2h de reperfusão, reduzindo após 12h. Em nenhuma das variáveis analisadas houve diferença entre grupos.

No segmento sob DIL as alterações ocorreram apenas na serosa, caracterizando-se por infiltrado de neutrófilos as 2 e 12h de reperfusão (Fig. 10) e descamação de células mesoteliais após 2h de isquemia (Fig. 11) em todos os grupos. Na camada muscular observou-se infiltrado de neutrófilos em todos os grupos após 12h de reperfusão, porém sem significância estatística. Em nenhuma das variáveis analisadas houve diferença entre grupos nos diferentes tempos.

Em algumas amostras do jejuno colhidas à distância dos segmentos instrumentados foram encontradas alterações de mucosa, porém essa foi discreta e não diferiu do controle (Tab. 9 e 10).

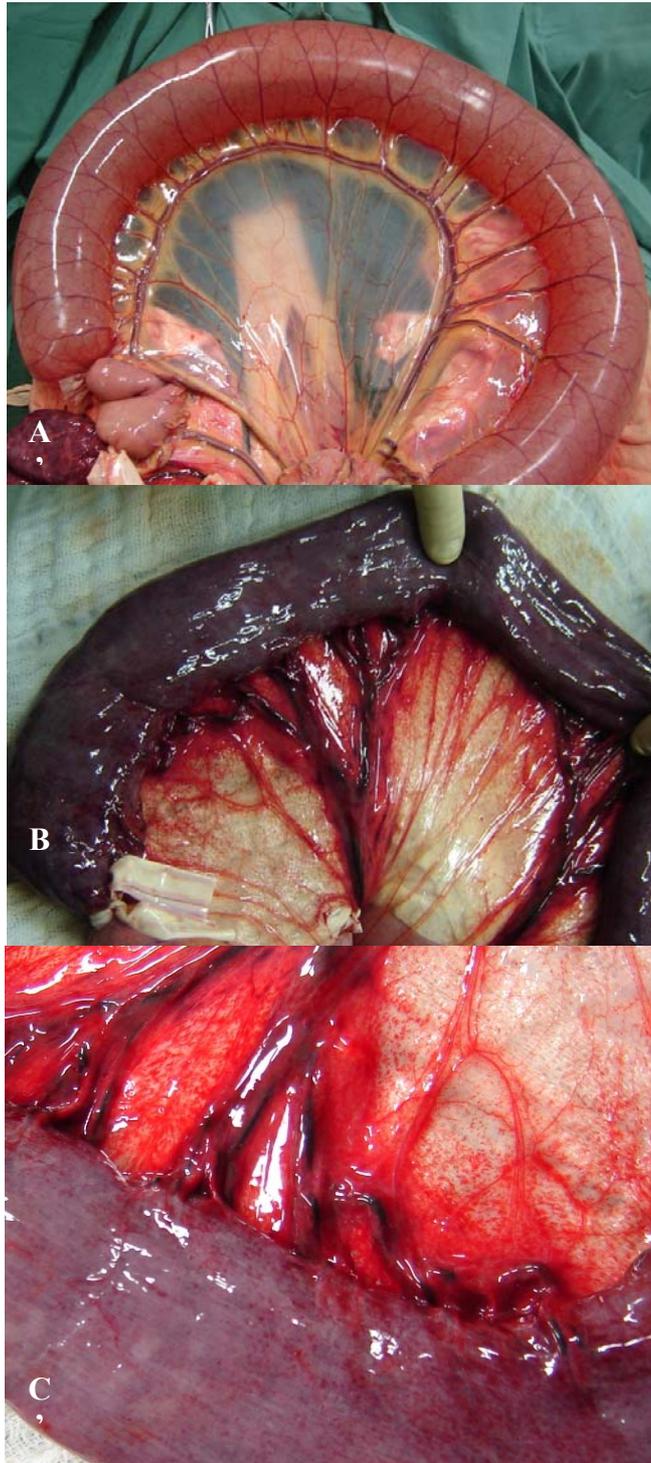


Figura 3. Alterações macroscópicas do jejuno após de 2h de isquemia induzida. 2A - A serosa do segmento sob distensão intraluminal encontra-se hiperêmica e com os vasos mais evidentes. 2B - No segmento sob isquemia venosa completa a coloração da serosa é vermelha escura. 2C - Distensão e hiperemia das artérias e veias jejunais e hemorragia na serosa e mesentério do segmento sob isquemia venosa completa. Equino do grupo controle.

Tabela 9. Média (M) e desvio padrão (SD) de escores para degeneração do jejuno submetido isquemia venosa completa no tempo basal (T0), após 2h de isquemia, 2 e 12h de reperfusão e no segmento distante após 12h de reperfusão em 18 equinos divididos nos grupos controle (C), glutamina (T1) e multimodal (T2) constituído da associação de succinato sódico de hidrocortisona, pentoxifilina, ácido ascórbico e dimetil sulfoxido.

		Grupo Controle (C)					Grupo Glutamina (T1)					Grupo Multimodal (T2)									
		Basal	Isquemia		Reperfusão		Seg	Basal	Isquemia		Reperfusão		Seg	Basal	Isquemia		Reperfusão		Seg		
			2h	2h	12h	Distante		2h	2h	12h	Distante		2h	2h	12h	Distante		2h	12h	Distante	
Hemorragia	Erosão Mucosa	M	0,0a	3,3bA	4,2bA	3,9bA	1,0aA	0,0a	3,3bA	3,9bA	2,3cA	0,5aA	0,0a	3,0bA	3,8bA	2,9cA	0,7aA				
		SD	0,0	0,8	0,5	1,3	0,6	0,0	1,3	1,0	1,5	0,5	0,0	0,6	0,8	1,5	0,5				
	Mucosa	M	0,0a	3,8bA	3,3bA	2,8bA	0aA	0,0a	3,8bA	3,1cA	2,6cA	0,0aA	0,0a	3,8bA	3,0cA	2,4cA	0,0aA				
		SD	0,0	0,4	0,9	0,9	0,0	0,0	0,4	0,5	0,5	0,0	0,0	0,3	0,7	0,7	0,0				
	Submucosa	M	0,0a	2,7bA	2,9bA	3bA	0,0aA	0,0a	2,9bA	3,3bA	3,4bA	0,2aA	0,0a	3,5bA	3,5bA	3,6bA	0,0aA				
		SD	0,0	1,0	0,6	0,5	0,0	0,0	0,7	0,5	0,6	0,4	0,0	0,3	0,4	0,5	0,0				
Neutrófilos	Muscular	M	0,0a	2,2bA	2,3bA	2,2bA	0,0aA	0,0a	2,1bA	1,8bA	1,8bA	0,0aA	0,0a	2,6bA	2,3bA	2,0bA	0,0aA				
		SD	0,0	1,1	0,9	1,0	0,0	0,0	0,4	0,9	0,5	0,0	0,0	0,6	0,5	0,4	0,0				
	Serosa	M	0,0a	2,3bA	2,0bA	1,4bA	0,0aA	0,0a	2,2bA	2,8bA	2,4bA	0,0aA	0,0a	2,8bA	2,8bA	2,4bA	0,0aA				
		SD	0,0	1,0	1,3	0,9	0,0	0,0	0,3	0,5	0,4	0,0	0,0	0,9	0,5	0,6	0,0				
	Mucosa	M	0,0a	0,0a	0,2aA	0,0a	0,0aA	0,0a	0,0a	0,8aA	0,3aA	0,0aA	0,0a	0,2aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA				
		SD	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,5	0,0	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0				
Edema	Submucosa	M	0,2a	0,5aA	0,8aA	0,5aA	0,2aA	0,0a	1,5aA	0,8aA	0,3aA	0,0aA	0,5a	1,2aA	0,8aA	1,3aA	0,2aA				
		SD	0,4	0,8	1,2	0,8	0,4	0,0	1,2	0,9	0,5	0,0	0,5	1,0	0,8	0,8	0,4				
	Muscular	M	0,0a	0,8aA	0,3aA	0,5aA	0,0aA	0,0a	1,3bA	1,1bA	1,6bA	0,0aA	0,0a	1,3bA	1,0bA	1,7bA	0,0aA				
		SD	0,0	0,8	0,6	0,8	0,0	0,0	1,0	1,0	0,5	0,0	0,0	0,8	0,8	1,1	0,0				
	Serosa	M	0,0a	1,0a	1,8bA	2,5bA	0,0aA	0,0a	0,3aA	1,8bA	1,8bA	0,0aA	0,2a	0,8aA	2,0bA	2,3bA	0,0aA				
		SD	0,0	1,1	1,1	0,4	0,0	0,0	0,6	1,1	0,5	0,0	0,4	0,8	0,8	0,4	0,0				
Outros	Mucosa	M	0,0a	0,3aA	0,2aA	0,5aA	0,0aA	0,0a	0,2aA	1,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0a	0,2aA	0,7aA	0,8aA	0,0aA				
		SD	0,0	0,8	0,4	1,2	0,0	0,0	0,4	0,9	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	0,9	0,0				
	Submucosa	M	0,0a	2,4bA	2,1bA	2,0bA	0,2aA	0,0a	2,8bA	2,1bA	1,9bA	0,0aA	0,0a	2,3bA	1,8bA	1,8bA	0,0aA				
		SD	0,0	1,0	1,5	1,4	0,4	0,0	0,7	1,3	0,2	0,0	0,0	0,4	1,2	0,8	0,0				
	Muscular	M	0,0a	0,4aA	0,8aA	0,8aA	0,0aA	0,0a	0,4aA	0,5aA	0,3aA	0,0aA	0,0a	0,5aA	0,3aA	0,5aA	0,0aA				
		SD	0,0	0,7	1,3	0,7	0,0	0,0	0,7	0,5	0,5	0,0	0,0	0,8	0,6	0,5	0,0				
Outros	Serosa	M	0,0a	0,6aA	0,8aA	0,5aA	0,0aA	0,0a	0,0a	0,3aA	0,5aA	0,0aA	0,0a	0,2aA	0,5aA	0,6aA	0,0aA				
		SD	0,0	0,7	0,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,4	0,5	0,7	0,0				
	Desc Mes**	M	0,5a	1,4bA	1,4bA	1,7bA	0,2aA	0,2a	1,7bA	1,3bA	1,3bA	0,0aA	0,2a	1,7bA	1,5bA	1,3bA	0,0aA				
		SD	0,8	0,4	0,8	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,0	0,4	0,4	0,4	0,8	0,0				
	Dis Lin**	M	0,2a	0,9aA	1,5bA	0,9aA	0,0aA	0,0a	1,0a	1,3bA	1,1bA	0,0aA	0,2a	1,3aA	1,6bA	0,8aA	0,0aA				
		SD	0,4	0,8	0,4	0,8	0,0	0,0	0,8	0,8	0,7	0,0	0,4	0,4	0,2	0,6	0,0				
Fibr Ser**	M	0,0a	0,2aA	0,9aA	0,7aA	0,0aA	0,0a	0,0a	0,0aA	0,3aA	0,0aA	0,0a	0,4aA	0,6aA	0,3aA	0,0aA					
	SD	0,0	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0					

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas entre si de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05.

**Desc mes – descamação de células mesoteliais; Dis Lin – distensão de vasos linfáticos; Fibr Ser – Deposição de fibrina na serosa

Tabela 10. Média (M) e desvio padrão (SD) de escores para degeneração do jejuno submetido a distensão intraluminal no tempo basal (T0), após 2h de isquemia, 2 e 12h de reperfusão e no segmento distante após 12h de reperfusão em 18 equínos divididos nos grupos controle (C), glutamina (T1) e multimodal (T2) constituído da associação de succinato sódico de hidrocortisona, pentoxifilina, ácido ascórbico e dimetil sulfóxido.

		Grupo Controle (C)					Grupo Glutamina (T1)					Grupo Coquetel (T2)					
		Isquemia		Reperfusão		Seg	Isquemia		Reperfusão		Seg	Isquemia		Reperfusão		Seg	
		Basal	2h	2 h	12 h	Distante	Basal	2h	2 h	12 h	Distante	Basal	2h	2 h	12 h	Distante	
Hemorragia	Erosão Mucosa	M	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,8aA	1,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,5aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,5aA	0,7aA
		SD	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5
	Mucosa	M	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,8aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,3aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,5aA	0,0aA
		SD	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
	Submucosa	M	0,0aA	0,5aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,3aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,3aA	0,2aA	0,0aA
		SD	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,8	0,0	0,4	0,0	0,0	0,5	0,4	0,0
Muscular	M	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,3aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,2aA	0,0aA	
	SD	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	
Serosa	M	0,0aA	0,0aA	0,4aA	0,3aA	0,0aA	0,0aA	0,6aA	1,0aA	1,4aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,8aA	1,2aA	0,0aA	
	SD	0,0	0,0	1,0	0,8	0,0	0,0	0,9	0,9	0,8	0,0	0,0	0,4	0,9	0,9	0,0	
Neutrófilos	Mucosa	M	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA
		SD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Submucosa	M	0,2aA	0,5aA	0,3aA	0,4aA	0,2aA	0,0aA	0,7aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	0,5aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA
		SD	0,4	0,5	0,5	0,7	0,4	0,0	0,5	0,0	0,4	0,0	0,5	0,4	0,0	0,0	0,4
	Muscular	M	0,0aA	0,0aA	0,0aA	1,1aA	0,0aA	0,0aA	0,4aA	0,8aA	1,3aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,5aA	1,5aA	0,0aA
		SD	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,7	0,8	0,8	0,0	0,0	0,4	0,8	0,8	0,0
Serosa	M	0,0aA	0,0aA	1,3bA	2,4bA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	1,2bA	1,6bA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	1,8bA	2,3bA	0,0aA	
	SD	0,0	0,0	1,6	1,3	0,0	0,0	0,0	1,1	0,9	0,0	0,4	0,0	0,6	0,5	0,0	
Edema	Mucosa	M	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA
		SD	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Submucosa	M	0,0aA	0,3aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	0,2aA	0,3aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA
		SD	0,0	0,5	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
	Muscular	M	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA
		SD	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
Serosa	M	0,0aA	0,0aA	0,3aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	
	SD	0,0	0,0	0,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	
Outros	Desc Mes**	M	0,5aA	1,3bA	1,3bA	1,4bA	0,2aA	0,2aA	1,5bA	1,3bA	1,8bA	0,0aA	0,2aA	1,4bA	1,4bA	1,3bA	0,0aA
		SD	0,8	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,0	0,4	0,8	0,5	0,3	0,0
	Dis Lin**	M	0,2aA	0,0aA	0,7aA	0,8aA	0,0aA	0,0aA	0,3aA	0,3aA	0,3aA	0,0aA	0,2aA	0,6aA	1,3aA	1,0aA	0,0aA
		SD	0,4	0,0	0,5	0,6	0,0	0,0	0,6	0,6	0,5	0,0	0,4	0,9	0,4	0,6	0,0
	Fibr Ser**	M	0,0aA	0,0aA	0,5aA	0,3aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,2aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,3aA	0,0aA
		SD	0,0	0,0	0,5	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0

*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas entre si de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. P<0,05.

**Desc mes – descamação de células mesoteliais; Dis Lin – distensão de vasos linfáticos; Fibr Ser. – Deposição de fibrina na serosa

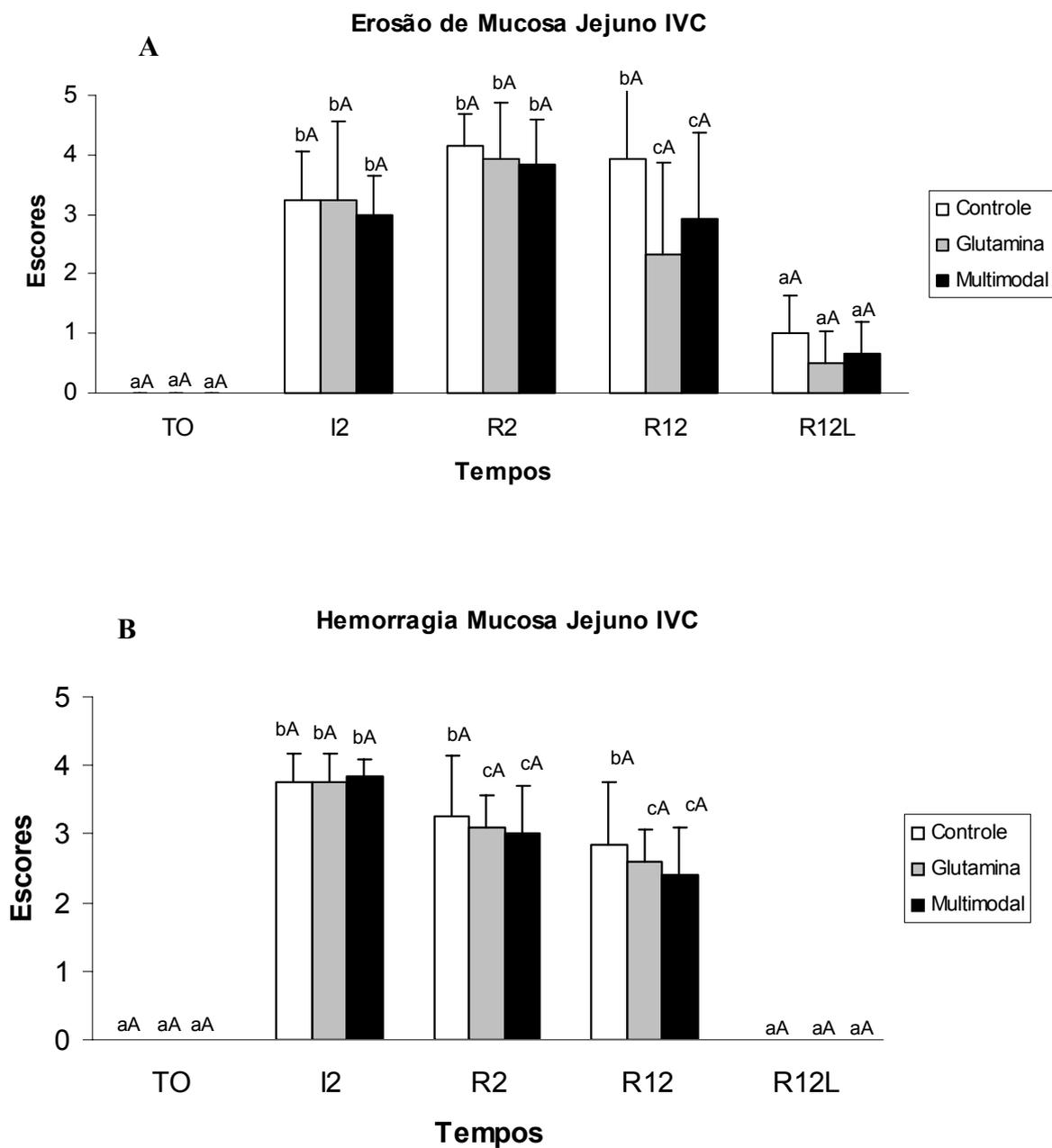


Figura. 4. Média e desvio padrão dos escores de lesão (A) e hemorragia (B) de mucosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperusão; R12: 12h de reperusão; R12L: 12h de reperusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

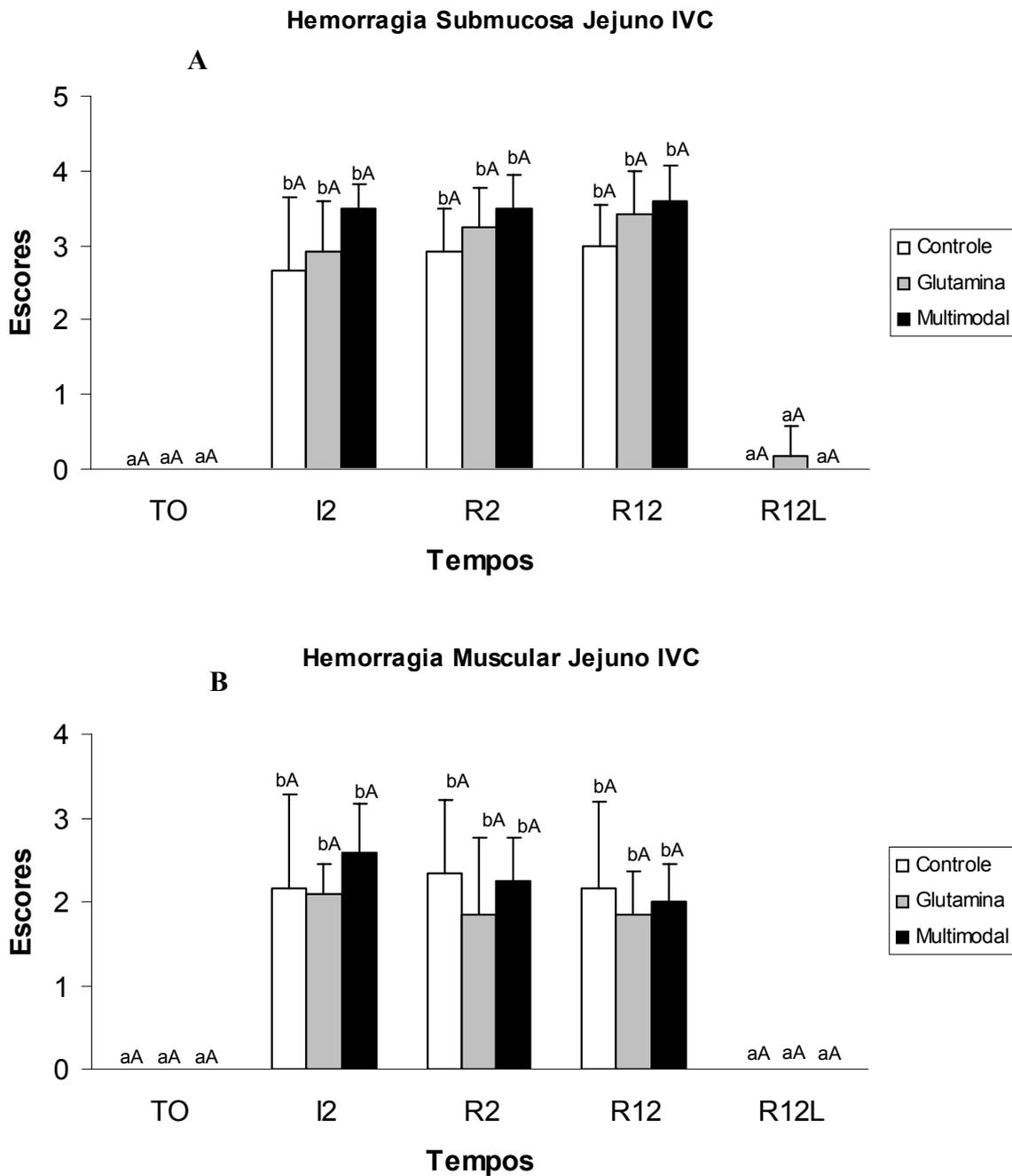


Figura. 5. Média e desvio padrão dos escores de hemorragia das camadas submucosa (A) e muscular (B) do jejunio sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperusão; R12: 12h de reperusão; R12L: 12h de reperusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Hemorragia Serosa Jejunio IVC

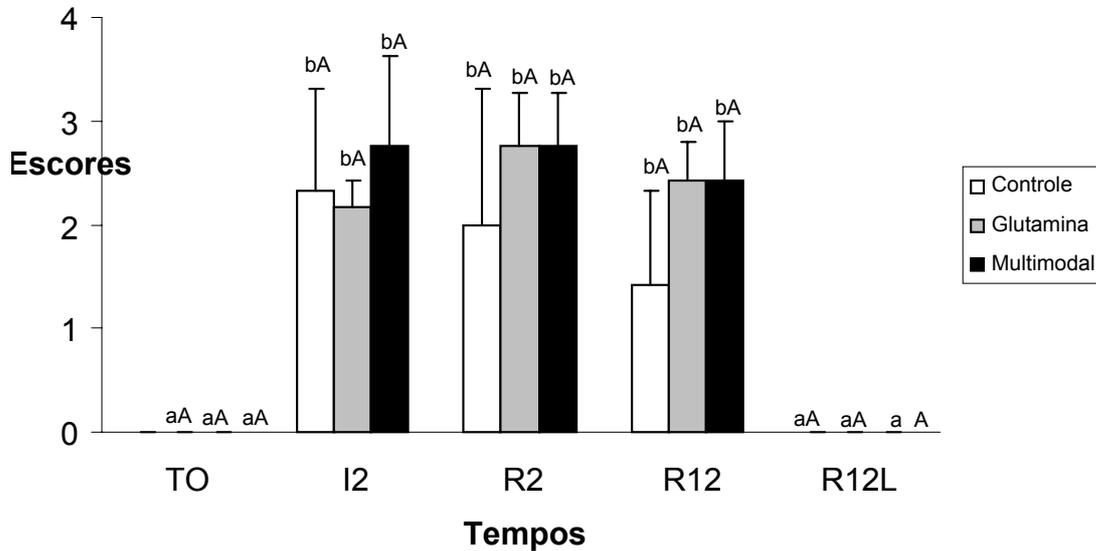


Figura. 6. Média e desvio padrão dos escores de hemorragia da serosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Neutrófilos Serosa Jejunio IVC

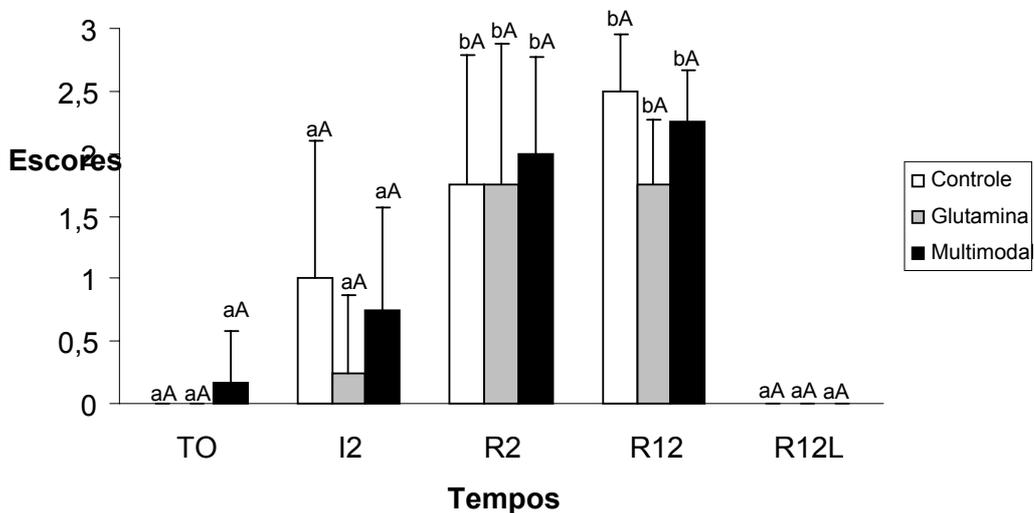


Figura. 7. Média e desvio padrão dos escores do infiltrado de neutrófilos da serosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Neutr3filos Muscular Jejun0 IVC

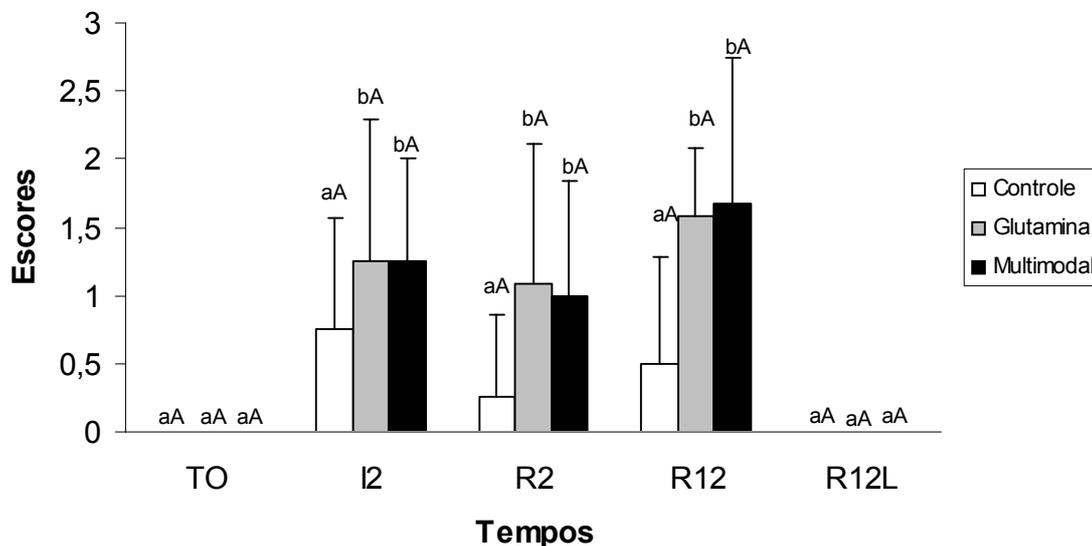


Figura. 8. M3dia e desvio padr3o dos escores de infiltrado de neutr3filos da camada muscular do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eq3inos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constitu3do da associa3o de 3cido asc3rbico, dimetilsulf3xido, pentoxifilina e succinato s3dico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfus3o; R12: 12h de reperfus3o; R12L: 12h de reperfus3o em segmento distante da les3o. M3dias seguidas de mesma letra min3scula n3o diferem entre si nos tempos. M3dias seguidas de mesma letra mai3scula n3o diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Edema Submucosa Jejun0 IVC

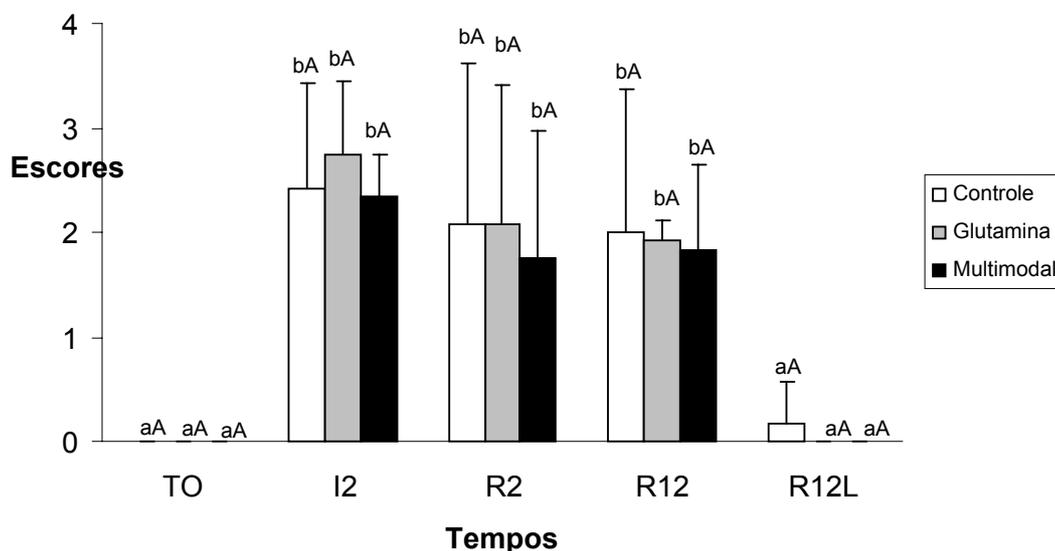


Figura. 9. M3dia e desvio padr3o dos escores de edema de submucosa do jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) em 18 eq3inos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constitu3do da associa3o de 3cido asc3rbico, dimetilsulf3xido, pentoxifilina e succinato s3dico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfus3o; R12: 12h de reperfus3o; R12L: 12h de reperfus3o em segmento distante da les3o. M3dias seguidas de mesma letra min3scula n3o diferem entre si nos tempos. M3dias seguidas de mesma letra mai3scula n3o diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Neutrófilos Serosa Jejunu DIL

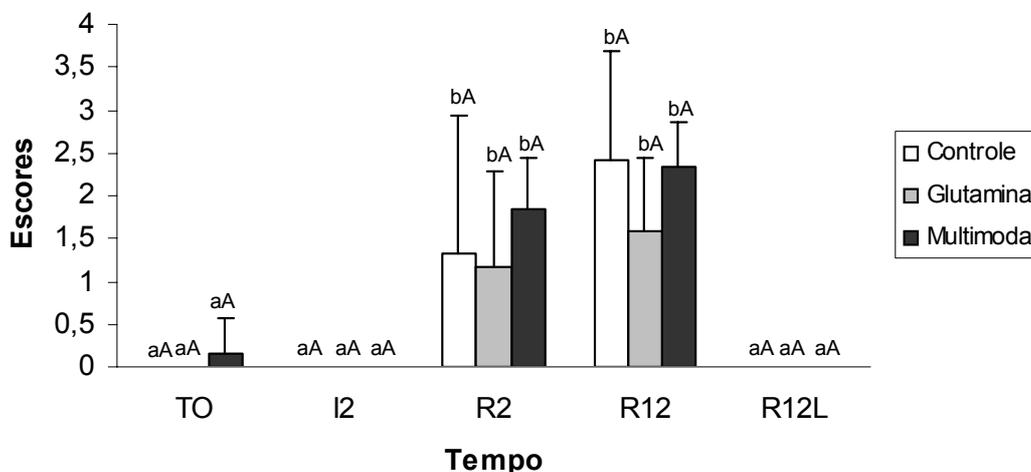


Figura. 10. Média e desvio padrão dos escores de infiltrado de neutrófilos na camada serosa do jejunu sob distensão intraluminal (DIL) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperusão; R12: 12h de reperusão; R12L: 12h de reperusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Descamação Células Mesoteliais Jejunu DIL

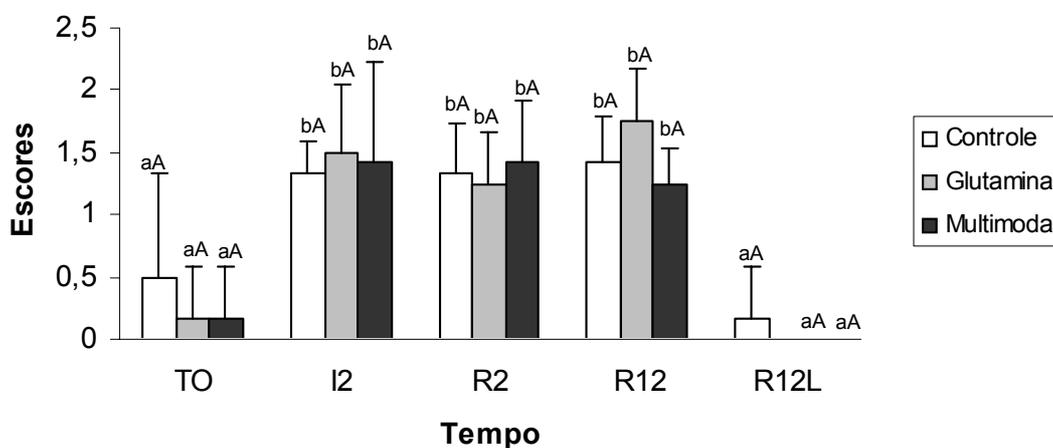


Figura. 11. Média e desvio padrão dos escores de descamação de células mesoteliais na camada serosa do jejunu sob distensão intraluminal (DIL) em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperusão; R12: 12h de reperusão; R12L: 12h de reperusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

4.3.2. Demais órgãos

Não foram observadas alterações no fígado, pâncreas, coração e rim. No tecido laminar, os

escores corresponderam à lesão moderada e foram semelhantes em todos os grupos, estando expressos na Tab. 11 e ilustrados nas Figs. 12A e 12B. Em algumas amostras foram adotados escores

intermediários devido à presença adicional de alterações de escores adjacentes. Assim, nas amostras com escore 0,5 a alteração visualizada foi estreitamento das lâminas dérmicas secundárias (Lds) sem outras alterações compatíveis com o escore 1 (Tab. 7). Nas amostras de escore 1,5 também se observou ausência das lâminas dérmicas

primárias (Ldp) entre as lâminas dérmicas secundárias (Lds), conforme uma das alterações descritas no escore 2. Para os escores 2,5, encontrou-se também estreitamento das lâminas epidérmicas primárias (Lep), sendo essa alteração uma das constituintes do escore 3.

Tabela 11. Média e desvio padrão (DP) dos escores de lesão do tecido laminar dos cascos dos membros torácicos esquerdo (CAS AD) e direito (CAS AE) após 12h de reperfusão em 18 eqüinos submetidos simultaneamente a distensão intraluminal e obstrução venosa de jejuno e divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona.

	CONTROLE		GLUTAMINA		MULTIMODAL	
	CAS AD	CAS AE	CAS AD	CAS AE	CAS AD	CAS AE
	1,5	1,5	1,5	2,0	1,0	1,0
	3,0	3,0	1,0	1,5	2,0	1,5
	1,0	1,0	1,5	1,0	2,5	2,5
	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0
	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5	0,5
	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,5
Média*	1,5^a	1,58^a	1,0^a	1,1^a	1,25^a	1,33^a
DP	0,894427	0,801041	0,5	0,65192	0,821584	0,68313

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (P<0,05).

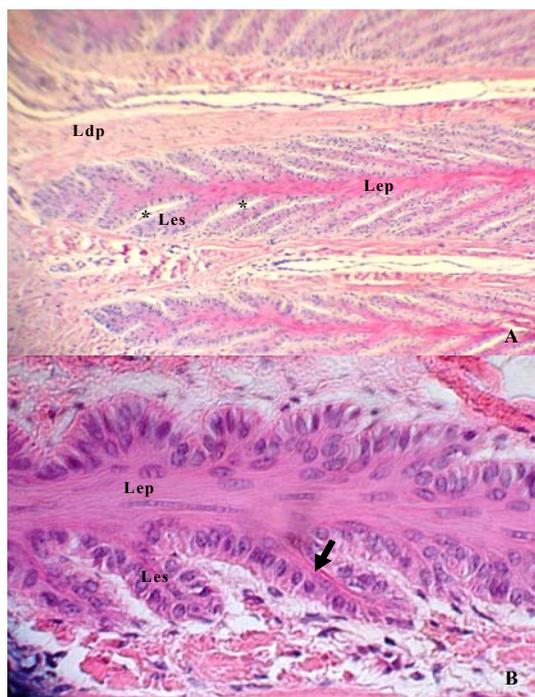


Figura 12. Microfotografia de corte histológico do tecido laminar do dígito de eqüino do grupo controle com escore de lesão 1,5 após 12h de reperfusão em segmentos de jejuno submetidos simultaneamente a distensão intraluminal e isquemia venosa completa. A - Lâminas epidérmicas secundárias (Les) estreitas e ausência das lâminas dérmicas primárias (Ldp) entre as Les (*). H&E, Ob. 10x. Núcleo das células basais arredondados (seta) e próximos à membrana basal (seta) (B) H&E, Ob. 40x.

Na avaliação do tecido pulmonar, duas amostras do grupo C e uma do T1 foram desconsideradas na avaliação de lesões decorrentes da alteração intestinal induzida devido à presença de eosinófilos no parênquima (Fig. 13A) e exsudato bronquiolar com infiltrado de neutrófilos (Fig. 13B), o que, segundo Faleiros (2003), pode caracterizar lesão prévia. Foi observado infiltrado de neutrófilos discreto em dois animais do grupo C e em um do grupo T2 (Fig. 13C). Nas demais amostras, não foram visualizados neutrófilos.

4.4. Análise ultraestrutural e mensuração da área, perímetro e número de vilosidades por mm²

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu avaliar de forma detalhada as lesões de mucosa observadas na histopatologia sendo compatíveis com os escores observados na microscopia óptica (Fig.14). Em amostras com escore de lesão 1, tanto no segmento DIL quanto no segmento distante, à MEV observou-se achatamento das vilosidades com perda de suas rugosidades. No entanto, em algumas amostras de escore 0 foram observadas as mesmas características (Fig. 15). As imagens obtidas pela MEV também possibilitaram realizar as medidas da área, do perímetro e do número de vilosidades por mm². A área das vilosidades aumentou no

grupo C após 12h de reperfusão, não se alterando nos demais grupos (Fig. 16). O perímetro das vilosidades aumentou às 12h de reperfusão no grupo C (Fig. 17) e o número de vilosidades por mm² diminuiu após 12h de reperfusão nos grupos T1 e T2 (Fig. 18). Em nenhuma das medidas houve diferença entre grupos nos tempos.

4.5. Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Nos segmentos sob DIL a atividade de MPO aumentou após 2h de reperfusão, sendo os valores absolutos superiores aos do segmento sob IVC em todos os grupos (Tab. 12 e Fig. 19A). Nas camadas mucosa e submucosa a MPO foi superior aos valores obtidos na muscular e serosa em todos os tempos e grupos (Tab. 13, Fig. 20A e 20B). No jejuno IVC a MPO aumentou nos grupos C e T1 após 2h de isquemia e no grupo T2 após 2h de reperfusão (Tab. 12 e Fig. 19B). Em nenhuma das análises houve diferença entre grupos.

Os valores de MPO foram superiores no pulmão em todos os grupos e gradativamente menores no tecido laminar do casco esquerdo, no pâncreas, no coração, no rim, no fígado e no tecido laminar do casco direito (Tab. 14). Não houve diferença na MPO entre grupos em nenhum dos órgãos avaliados.

4.6. Mediadores inflamatórios

O mRNA do TNF- σ foi detectado, no entanto suas concentrações diminuíram de forma gradativa ao longo do tempo sem diferença estatística tanto no segmento sob DIL quanto sob IVC (Fig. 21). As concentrações de mRNA de GCP-2 foram mais elevadas às 2h de isquemia com diminuição às 2h de reperfusão e aumento às 12h de reperfusão em ambos os segmentos, no entanto, sem diferença significativa (Fig. 22).

As curvas de RT-PCR indicando o número de ciclos (Ct - "Cycle threshold") e de temperatura de fusão (Tm - "melting curve") das amostras de intestino para TNF- σ estão expostas nos Anexo 1 e 2.

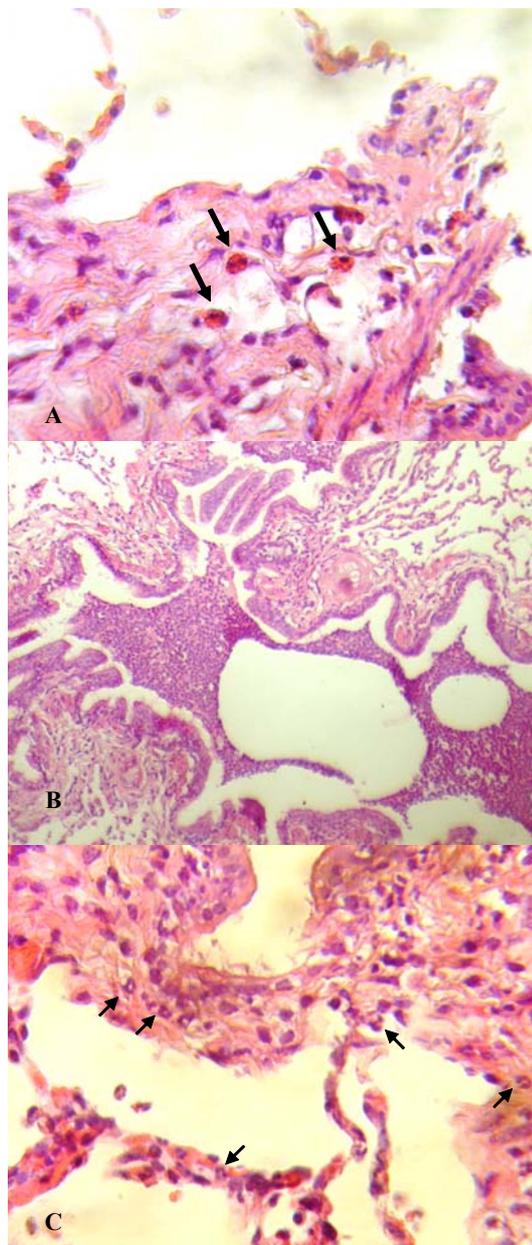


Figura 13 – Microfotografia de corte histológico de tecido pulmonar após 12h de reperfusão em segmentos de jejuno submetidos simultaneamente à distensão intraluminal e isquemia venosa completa. (A) Presença de eosinófilos (setas) e (B) exsudato bronquiolar com presença de neutrófilos característicos de lesão prévia. (C) Infiltrado de neutrófilos discreto no parênquima pulmonar (setas) indicativo de lesão pulmonar decorrente de reperfusão intestinal (C). H&E, Ob. 40x.

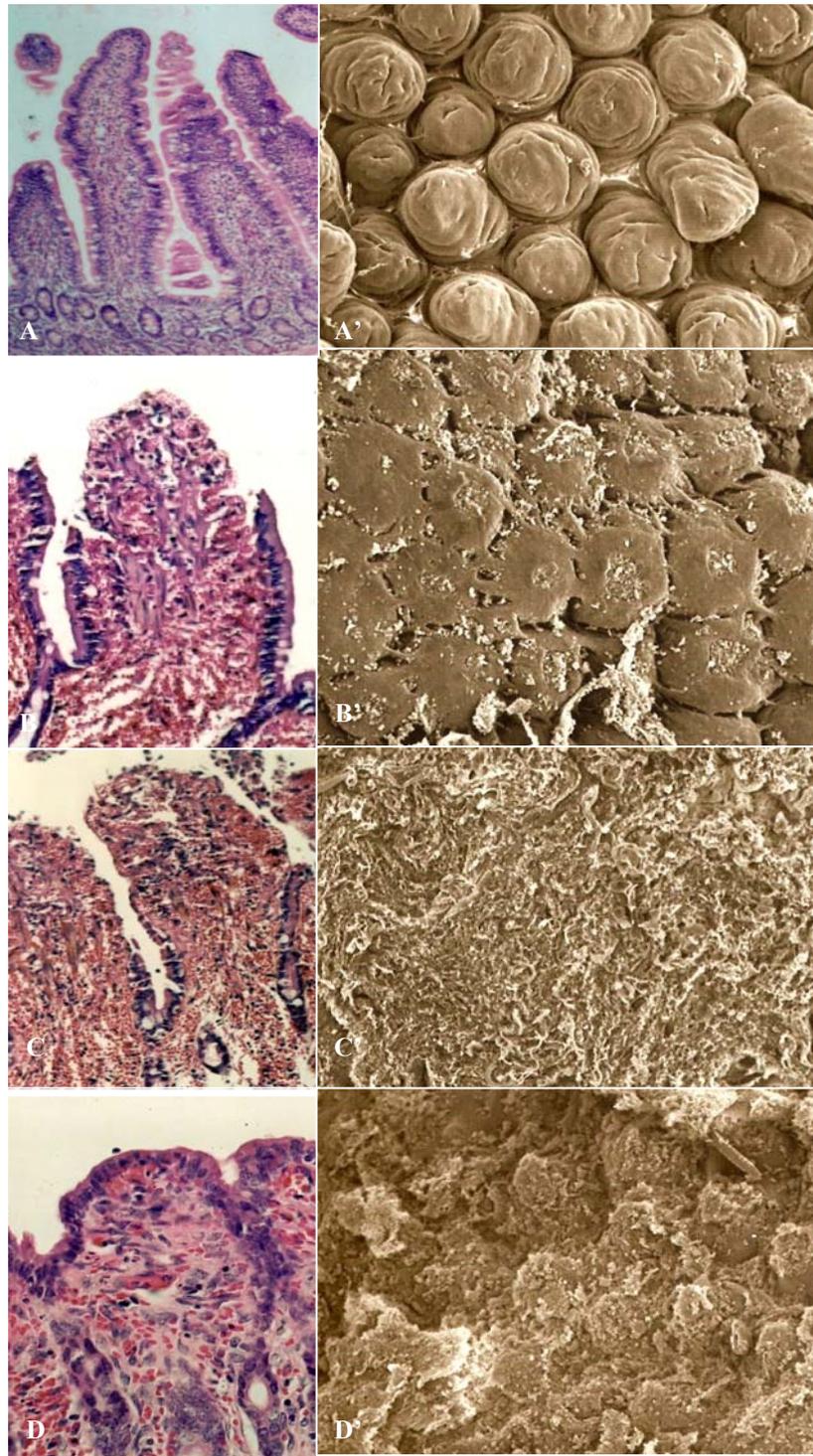


Figura 14 - Microfotografia evidenciando a progressão da erosão de mucosa pela microscopia óptica (A, B, C, D) e imagens de microscopia eletrônica de varredura (A', B', C',D'). A, A' - Escore 0 (tempo 0): mucosa íntegra (A - H&E, 31,2x e A' - 150x). B, B' - Escore 3 (2h de isquemia): exposição da lâmina própria até a metade da extensão das vilosidades (B - H&E, 75x e B' - 150x). C, C' - Escore 4 (2h de reperfusão): exposição da lâmina própria até a base das vilosidades (C - H&E, 75x e C' - 150x). D, D' - Vilosidades curtas, mas com recobrimento de células epiteliais (12h de reperfusão) (D - H&E, 100x e D' - 150x). Equino do Grupo Controle.

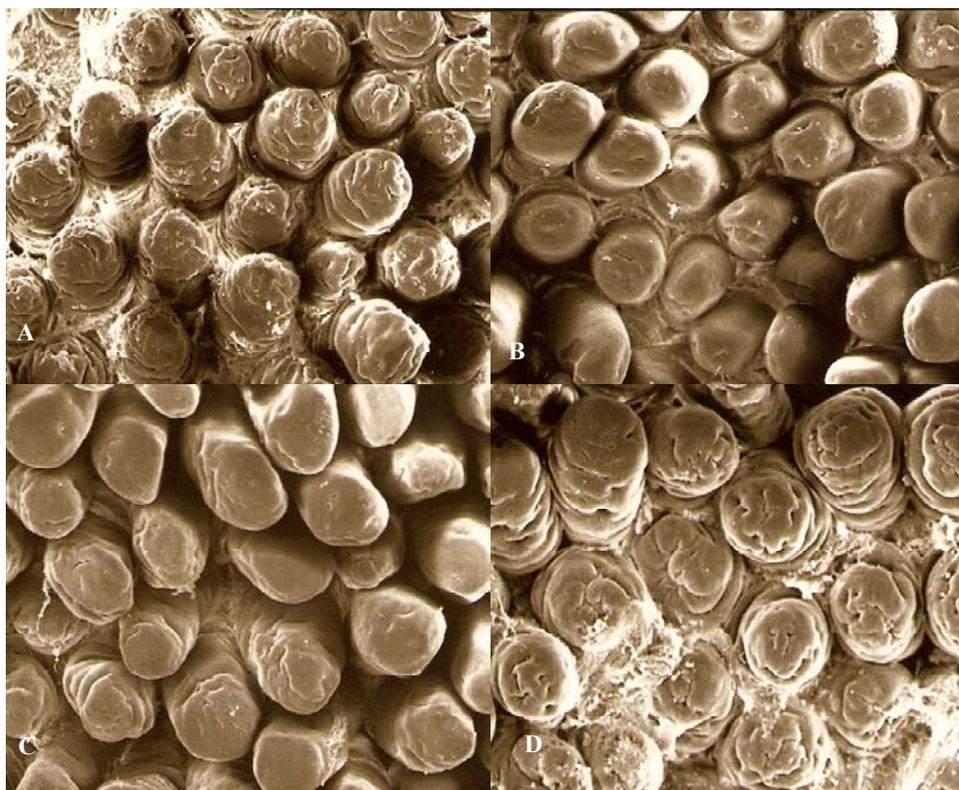


Figura 15. Imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciando aspectos das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal. Aspecto normal das vilosidades com rugosidades características no tempo 0 (A). Após 2h de isquemia, as rugosidades das vilosidades são menos evidentes (B). As 2h de reperfusão as rugosidades são ainda menos evidentes e as vilosidades encontram-se levemente achatadas (C). Após 12h de reperfusão, as vilosidades encontram-se visivelmente retraídas (D). Equino grupo controle. Escore zero (0) para erosão de mucosa à histopatologia. 150x.

Área das Vilosidades

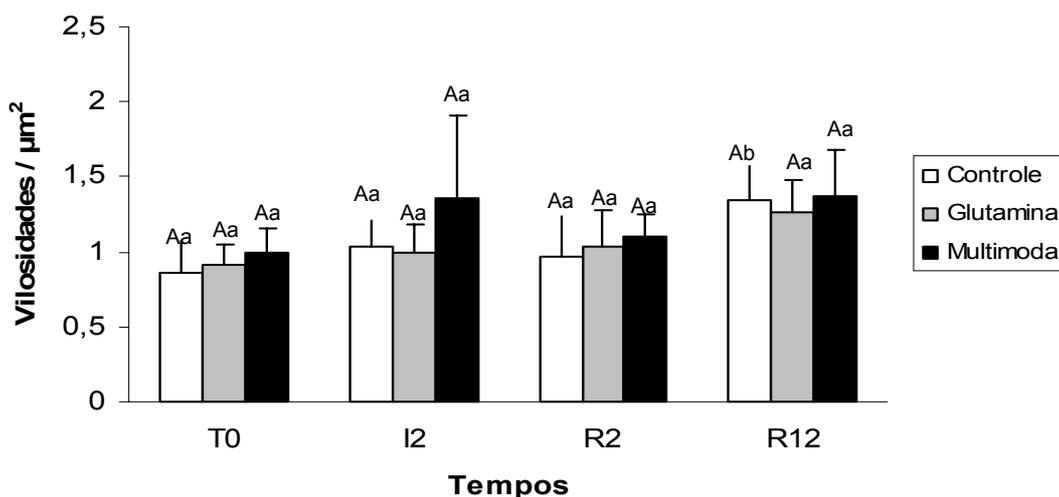


Figura 16. Valores médios e desvio padrão da área das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal em 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos $P < 0,05$.

Perímetro das Vilosidades

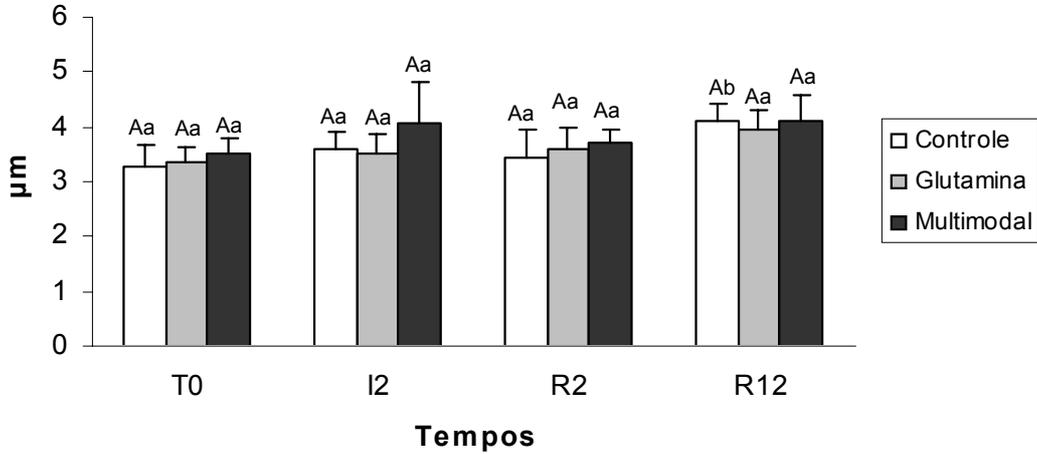


Figura 17. Valores médios e desvio padrão do perímetro das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperusão; R12: 12h de reperusão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Número de Vilosidades / mm²

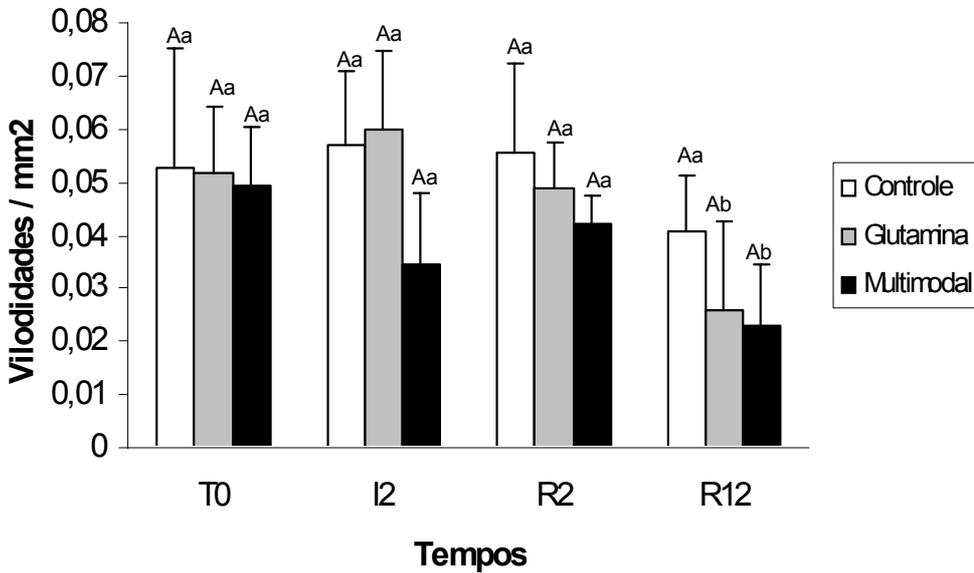


Figura 18. Valores médios e desvio padrão do número das vilosidades do jejuno sob distensão intraluminal em 18 eqüinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperusão; R12: 12h de reperusão. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si nos tempos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Tabela 12. Média (M) e desvio padrão (SD) da atividade de mieloperoxidase (MPO) do jejuno submetido à isquemia venosa e distensão intraluminal de 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona de amostras basal (T0), com 2h de isquemia (I2) e 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12) e em segmento distante à lesão após 12h de reperfusão (R12L).

MPO JEJUNO ISQUEMIA VENOSA															
CONTROLE					GLUTAMINA					MULTIMODAL					
	T0	I2	R2	R12	R12L	T0	I2	R2	R12	R12L	T0	I2	R2	R12	R12L
M	0,005aA	0,062bA	0,098bA	0,431bA	0,467bA	0,003aA	0,071bA	0,054bA	0,613bA	0,305bA	0,021aA	0,015aA	0,313bA	0,474bA	0,371bA
SD	0,0097	0,0574	0,1839	0,4667	0,4683	0,0023	0,126	0,0832	0,3291	0,2581	0,0377	0,015	0,429	0,2294	0,4682
MPO JEJUNO DISTENSÃO INTRALUMINAL															
M	0,005aA	0,042aA	0,739bA	0,703bA	0,466bA	0,003aA	0,051aA	0,819bA	0,769bA	0,305aA	0,021aA	0,038aA	0,717bA	0,937bA	0,371bA
SD	0,0097	0,0285	0,3857	0,3065	0,4683	0,0023	0,0417	0,4157	0,5082	0,2581	0,0377	0,4719	0,4222	0,5082	0,4682

Tabela 13. Média (M) e desvio padrão (SD) da atividade de mieloperoxidase (MPO) das camadas mucosa e submucosa e muscular e serosa do jejuno submetido a distensão intraluminal de 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona de amostras basal (T0), com 2h de isquemia (I2) e 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12).

MPO CAMADAS MUCOSA E SUBMUCOSA									
	CONTROLE			GLUTAMINA			MULTIMODAL		
	I2	R2	R12	I2	R2	R12	I2	R2	R12
M	0,038aA	0,629bA	0,568bA	0,049aA	0,663bA	0,617bA	0,037aA	0,649bA	0,704bA
SD	0,0259	0,4009	0,388	0,0383	0,403	0,2577	0,0405	0,2622	0,4222
MPO CAMADAS MUSCULAR E SEROSA									
M	0,004aA	0,127bA	0,162bA	0,002aA	0,157bA	0,152bA	0,001aA	0,176bA	0,233bA
SD	0,0051	0,0775	0,038	0,0018	0,0468	0,0622	0,0024	0,0942	0,1306

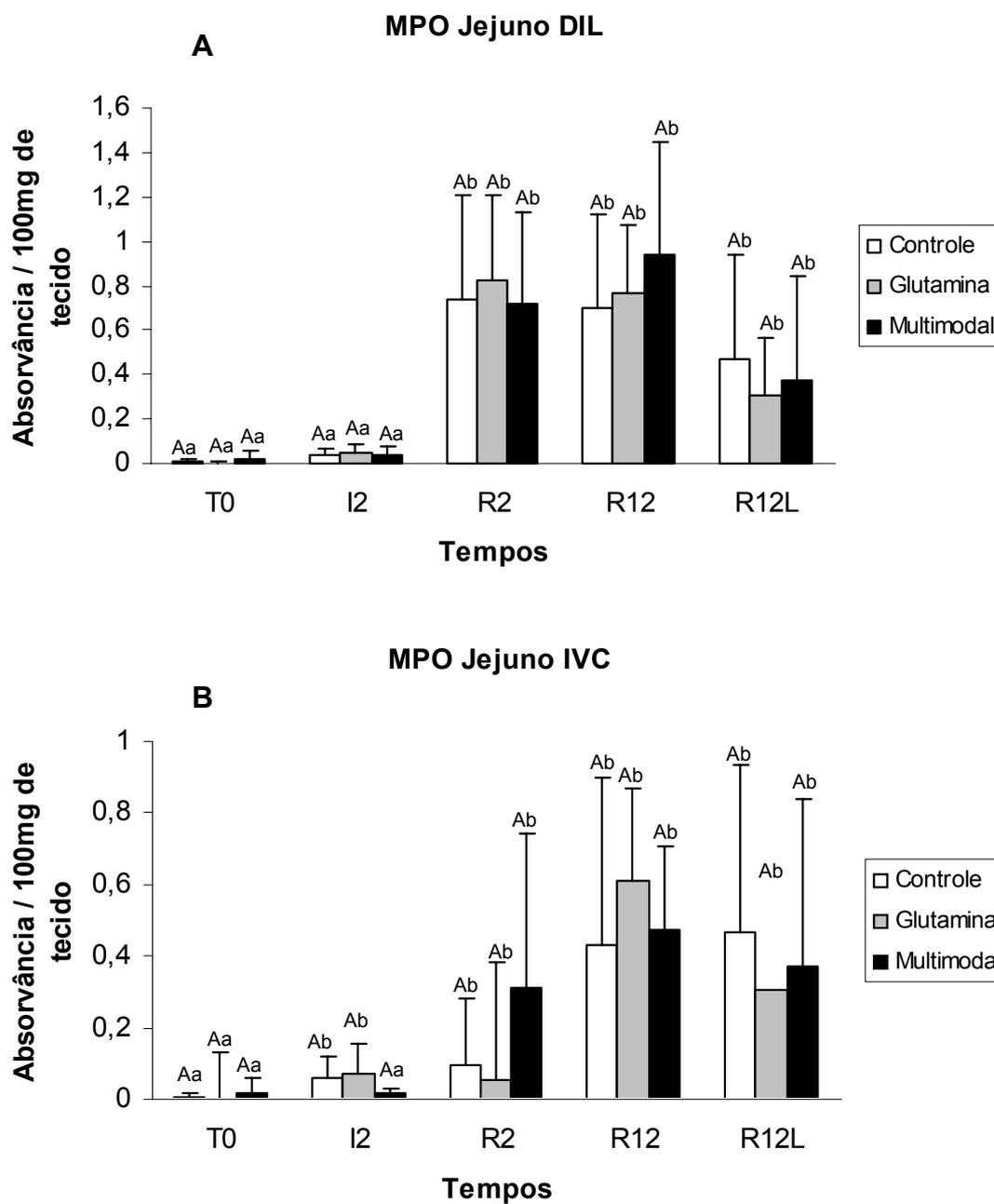
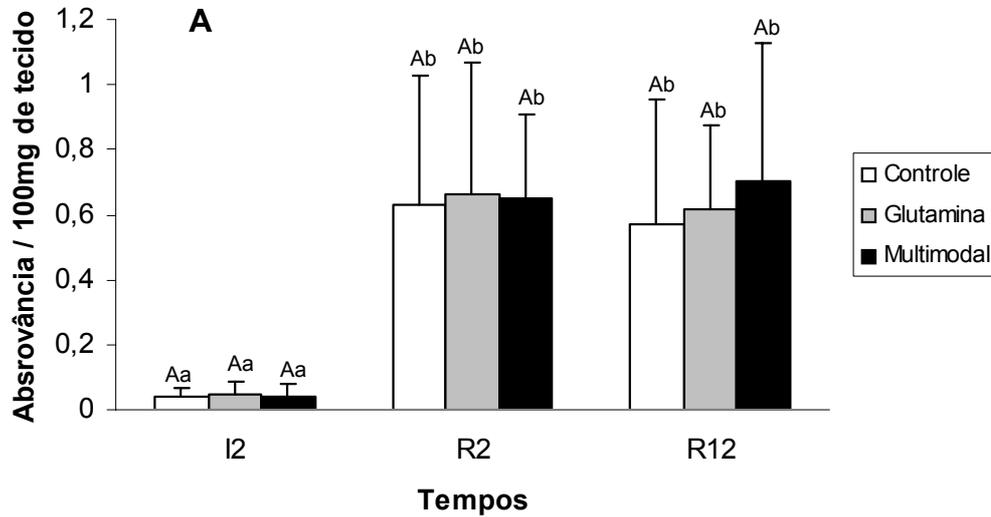


Figura 19. Média e desvio padrão da atividade de mieloperoxidase (MPO) do jejunum sob distensão intraluminal (DIL) (A) e isquemia venosa completa (IVC) (B) em 18 equinos divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. T0: antes da isquemia; I2: 2h de isquemia; R2: 2h de reperfusão; R12: 12h de reperfusão; R12L: 12h de reperfusão em segmento distante da lesão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo tempo. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

**MPO Jejuo DIL
Mucosa e Submucosa**



**MPO Jejuo DIL
Muscular e Serosa**

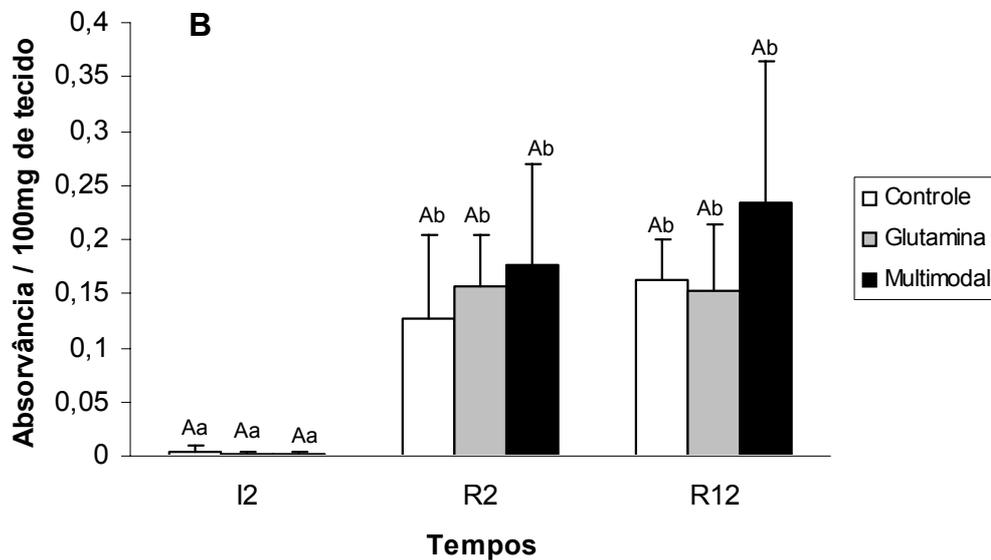


Figura 20. Média e desvio padrão da atividade de mieloperoxidase (MPO) no jejuo sob distensão nas camadas mucosa e submucosa (A) e nas camadas muscular e serosa (B) às 2h de isquemia (I2) e 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12, respectivamente), nos 18 equinos dos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si no mesmo tempo. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si entre grupos. $P < 0,05$.

Tabela 14. Valores médios e desvio padrão da atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido laminar dos cascos direito (CAS AD) e esquerdo (CAS AE), pulmão (PUL), pâncreas (PAN), coração (COR), rim (RIM) e fígado (FIG) em 18 equinos submetidos simultaneamente à isquemia por distensão intraluminal e obstrução venosa de jejuno e divididos nos grupos controle, glutamina e multimodal constituído da associação de ácido ascórbico, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e succinato sódico de hidrocortisona.

MPO CONTROLE							
	CAS AD	CAS AE	PUL	PAN	COR	RIM	FIG
Média	0,00558	0,0418	0,54092	0,03192	0,01892	0,0107	0,00788
<i>DP</i>	<i>0,0065</i>	<i>0,0206</i>	<i>0,5296</i>	<i>0,026</i>	<i>0,0227</i>	<i>0,0079</i>	<i>0,0163</i>
MPO GLUTAMINA							
	CAS AD	CAS AE	PUL	PAN	COR	RIM	FIG
Média	0,0035	0,05125	0,4493	0,0196	0,0164	0,0088	0,0079
<i>DP</i>	<i>0,00342</i>	<i>0,0054</i>	<i>0,3662</i>	<i>0,0165</i>	<i>0,0115</i>	<i>0,0049</i>	<i>0,0097</i>
MPO MULTIMODAL							
	CAS AD	CAS AE	PUL	PAN	COR	RIM	FIG
Média	0,0065	0,051667	1,01442	0,02725	0,02467	0,0402	0,00975
<i>DP</i>	<i>0,004868</i>	<i>0,003445</i>	<i>0,10527</i>	<i>0,02622</i>	<i>0,0128</i>	<i>0,07843</i>	<i>0,00868</i>

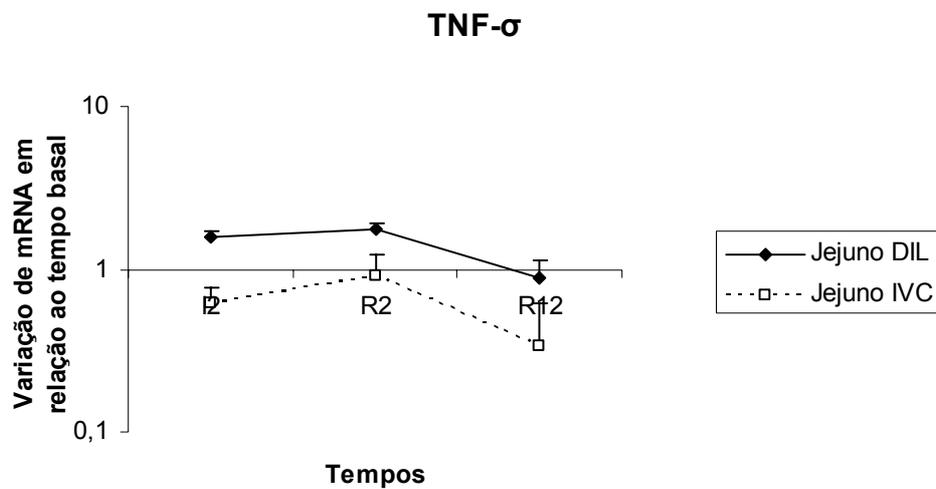


Figura 21. Valores médios da variação da expressão de mRNA para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ) nos segmentos de jejuno sob distensão intraluminal (DIL) e isquemia venosa completa (IVC) do grupo controle às 2h de isquemia (I2), e as 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12, respectivamente), em relação ao tempo basal considerado igual a um (1).

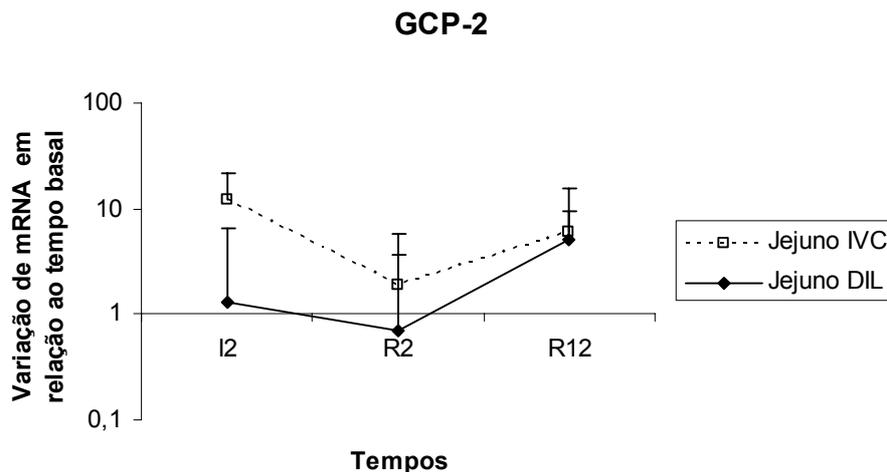


Figura 22. Valores médios da variação da expressão de mRNA para a proteína quimiotática de granulócitos 2 (GCP-2) nos segmentos de jejuno sob isquemia venosa completa (IVC) e distensão intraluminal (DIL) do grupo controle às 2h de isquemia (I2), e as 2 e 12h de reperfusão (R2 e R12, respectivamente), em relação ao tempo basal considerado igual a um (1).

5. DISCUSSÃO

5.1. Anestesia

No período de reperfusão intestinal, a pressão arterial diminuiu em todos os equinos, sendo necessária a administração de dobutamina até o final da anestesia. Tal fato decorre, normalmente, dos mediadores inflamatórios gerados durante a isquemia e das endotoxinas presentes no lúmen intestinal que podem ser absorvidos via circulação venosa e linfática após a desobstrução, causando as alterações hemodinâmicas como mencionadas por Moore e Barton (1998) e detectadas nos equinos deste experimento. Considerando a lesão de mucosa, a hemorragia e o edema observados à microscopia óptica e discutidas a seguir, é possível supor que a alteração hemodinâmica verificada tenha ocorrido por esses mecanismos isolados ou associados. Adicionalmente, é importante ressaltar que os equinos encontravam-se sob anestesia geral, o que também pode ter colaborado para a hipotensão acentuada decorrente da desobstrução intestinal. Apesar do midazolam e do éter gliceril guaiacolato serem fármacos que possuem pouca influência sobre a pressão arterial nas doses utilizadas neste experimento, o isoflurano pode causar hipotensão dose-dependente devido à depressão do sistema nervoso central, especialmente quando associado ao decúbito (Muir e Hubbel, 1991).

5.2. Alterações macroscópicas

As alterações macroscópicas verificadas foram compatíveis com as encontradas na microscopia óptica. A hemorragia e o edema facilmente visualizados no segmento sob IVC foram as alterações que atingiram o maior número de camadas quando avaliadas à histopatologia. Por outro lado, essas alterações foram discretas no segmento sob DIL, também conforme foi visualizado à microscopia. As alterações encontradas neste experimento também foram descritas em outros trabalhos realizados com metodologia semelhante em equinos (Freeman et al., 1988; Debareiner et al., 2001).

A necessidade de infusão de solução de NaCl 0,9% para a manutenção da pressão intraluminal no jejuno sob DIL relatada nos equinos desse experimento não foi descrita por Debareiner et

al. (2001) utilizando modelo experimental semelhante. Acredita-se que esse efeito possa ter decorrido, principalmente, devido ao relaxamento gradual do segmento intestinal no intuito de se adaptar à distensão, uma vez a absorção intraluminal de fluidos está diminuída em casos de distensão intraluminal (Allen e Tyler, 1990). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de extravasamento de líquido através das ligaduras realizadas nas extremidades do segmento distendido, uma vez que essas foram feitas com drenos de penrose, o qual é constituído de um material que permite alguma expansão. Sob esse aspecto, considera-se pertinente a mensuração da quantidade de líquido intraluminal ao final do período de obstrução em experimentos futuros com o mesmo modelo experimental para auxiliar na avaliação das causas que possam levar à perda de pressão intraluminal.

5.3. Alterações microscópicas e atividade de mieloperoxidase

5.3.1. Amostras intestinais

A erosão de mucosa ocorreu apenas no segmento sob IVC, iniciando-se durante a isquemia e mantendo-se durante a reperfusão. Esse resultado permite dizer que a hipóxia foi mais intensa na mucosa desse segmento do que no segmento sob DIL, fato que já foi comprovado em outros estudos onde se verificou que a perfusão vascular nas camadas serosa e muscular é menor que na mucosa e submucosa do jejuno sob distensão (Dabareiner et al., 1993). A extremidade das vilosidades foi a região mais acometida devido à maior sensibilidade de suas células à hipóxia em relação às que recobrem a cripta. Essas células, além de mais resistentes à hipóxia, são as primeiras envolvidas no reparo da mucosa nas primeiras horas após a lesão, por meio de migração e proliferação (Freeman et al., 1988).

O recobrimento do epitélio durante a regeneração da mucosa intestinal é facilitado pelo encurtamento das vilosidades nas primeiras horas após a lesão, evento dependente de energia e que ocorre, portanto, após a reoxigenação. Qualquer fator que possa inibir esse processo ocasiona, portanto, uma recuperação mais prolongada, o que predispõe à ocorrência de endotoxemia (Blikslager e Roberts, 1997). Na maioria das amostras intestinais avaliadas neste experimento

às 12h de reperfusão, a lesão da mucosa estava presente em grau elevado. No entanto, é importante ressaltar que a cobertura epitelial completa em casos de manipulação cirúrgica ocorre, em média, em 36h, podendo se prolongar em casos de alterações circulatórias importantes (Thornton e Barbul, 1997). Em íleo de suíno submetido à 2h de isquemia, a barreira epitelial foi recomposta após 18h e a restituição da arquitetura fisiológica somente após 48h (Blikslager et al., 1995).

As outras alterações mais visualizadas também no segmento de jejuno sob IVC foram a hemorragia, em todas as camadas, e o edema na submucosa. A hemorragia é conseqüente de lesões vasculares que cursam com aumento de permeabilidade e/ou pressão hidrostática aumentada (Vasconcelos, 2002). As lesões vasculares nos modelos de obstrução ocorrem primariamente devido à hipóxia das células endoteliais, o que, por si só, já cria condições para o extravasamento de hemáceas, conforme demonstrado em estudos realizados em diferentes modelos de obstrução de jejuno, tanto na fase de isquemia quanto na reperfusão (Debareiner et al., 2001). No entanto, esse é mais intenso nas obstruções venosas pois é somado a um aumento da pressão hidrostática capilar, o que também contribui para a formação do edema. Rio Tinto (1999) e Sullins et al. (1985), comparando lesões entre segmentos de jejuno submetidos a isquemia arteriovenosa completa (IAVC) e IVC, demonstraram que a presença de hemorragia e edema nesse último modelo é superior.

A hemorragia e o edema, conforme visualizados nas amostras colhidas neste experimento são atribuídos à formação de RLO (Debareiner et al., 2001). Embora em eqüinos ocorra a ativação da XO durante a isquemia e esta seja constituinte de um mecanismo fisiopatológico importante no desenvolvimento das lesões pela geração de RLO, é importante ressaltar que sua ação ocorre durante a reperfusão. Nos eqüinos desse experimento, a isquemia foi suficiente para provocar as lesões observadas, as quais se mantiveram durante a reperfusão. Durante a isquemia, é consenso a participação menor dos RLO na gênese das lesões e, recentemente, tem sido discutido com mais ênfase os mecanismos de lesão ocasionados pela resposta da célula endotelial à hipóxia (Pinheiro et al., 1999).

Embora não se tenha utilizado uma metodologia específica para avaliar a lesão endotelial nos eqüinos deste experimento, a hemorragia e o edema acentuados são evidências de lesão endotelial, a qual pode ter sido a principal causa das alterações verificadas durante a isquemia. As células endoteliais são as primeiras a responder à hipóxia, a partir da qual iniciam a produção de diversos mediadores inflamatórios promovendo o recrutamento e a ativação de neutrófilos no tecido, os quais colaboram para aumentar a lesão (Pinheiro et al., 1999). Apesar de a hipóxia também gerar a ativação e recrutamento de neutrófilos, não se pode descartar a importância das células endoteliais na fisiopatologia das lesões aqui verificadas durante a isquemia.

No jejuno sob DIL o infiltrado de neutrófilos ocorreu após 2h de reperfusão na serosa em todos os grupos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos utilizando o mesmo modelo experimental (Debareiner et al., 2001). No segmento sob IVC o infiltrado de neutrófilos ocorreu na camada muscular dos grupos T1 e T2 após 2h de isquemia e na serosa de todos os grupos após 2h de reperfusão, não sendo importante nas demais camadas, apesar da presença de outras alterações. O eqüino possui poucos neutrófilos no interstício intestinal, ficando a maioria confinados no endotélio durante a isquemia e na reperfusão (Moore, 1997). Tal fato levantou a hipótese da influência pouco expressiva dessas células nas lesões teciduais decorrentes de isquemia e reperfusão (I/R) em eqüinos (Blikslager et al. 1997). No entanto, Moore (1997) considerou que os neutrófilos encontrados no endotélio em situações de I/R podem causar lesão de mucosa devido à injúria vascular. Por outro lado, é possível que a hemorragia presente na mucosa e submucosa nas amostras deste experimento tenha dificultado a visualização dos neutrófilos. No intuito de evitar dificuldades como essa e avaliar melhor a evolução das lesões, alguns pesquisadores preferem não utilizar modelos de obstrução completa, como o utilizado no presente experimento e, sim, isquemia de baixo fluxo (Debareiner et al., 2005). Sullins et al. (1985) também comentaram a dificuldade de avaliar o edema devido a hemorragia elevada da mucosa em modelo experimental de IVC de jejuno de eqüinos. O modelo experimental de isquemia de baixo fluxo não foi adotado neste experimento, pois o objetivo era produzir lesões

correspondentes à maior prevalência das situações clínicas reais em equinos.

Com relação à presença pouco expressiva de neutrófilos nas camadas mucosa e submucosa do segmento sob IVC é pertinente realizar também algumas considerações a respeito do uso de antimicrobianos no pré-operatório nos equinos deste experimento, utilizados com o objetivo de diminuir a contaminação decorrente da manipulação cirúrgica. Dentre os antimicrobianos utilizados, a gentamicina, apesar de não ter alterado as concentrações de endotoxinas absorvidas em casos de afecções intestinais em potros, tem a capacidade de neutralizá-las (Atherton e Furr, 2006), podendo, assim, influenciar a ocorrência de translocação bacteriana (TB). No entanto, a concentração efetiva de gentamicina no intestino delgado após uma única injeção intravenosa é mantida por apenas duas horas (Snyder et al., 1986) o que permite dizer que, no final do período isquêmico nos animais deste experimento, sua concentração era mínima ou ausente. Apesar da meia vida da penicilina procaína em equinos ser de até 24h (Love et al., 1983), esse fármaco não possui ação sobre bactérias gram negativas (Plumb, 2002), as quais são os agentes de maior importância na ocorrência de TB (Moore e Barton, 1998). Por outro lado, deve-se considerar que o recrutamento de neutrófilos subsequente às obstruções intestinais não é dependente desse evento, podendo ocorrer em conseqüência apenas dos mediadores inflamatórios e das lesões teciduais gerados a partir da hipóxia (Souza et al., 2004). De acordo com o exposto, considera-se que o uso de antimicrobianos no pré-operatório dos equinos deste experimento não influenciou a TB e, assim, o recrutamento de neutrófilos por esse mecanismo.

Além das considerações discutidas anteriormente sobre o infiltrado de neutrófilos nas amostras deste experimento, é importante considerar que o fato dessas células terem sido encontradas principalmente na serosa possa ter sido decorrente predominantemente da manipulação cirúrgica. Assim, considera-se que, para a avaliação de infiltrado de neutrófilos no intestino submetido à obstrução experimental em equinos, sejam utilizados métodos alternativos complementares. Nos equinos deste experimento, o método escolhido foi a avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO). No entanto, quando

os resultados de MPO foram comparados à presença de infiltrado de neutrófilos, em alguns momentos foram condizentes e, em outros, discrepantes.

No jejuno sob DIL a MPO aumentou após 2h de reperfusão, semelhante ao infiltrado de neutrófilos na serosa. No segmento sob IVC os valores de MPO aumentaram após 2h de isquemia e 2h de reperfusão nos grupos T1 e T2, respectivamente. No grupo C houve discordância, pois a MPO foi detectada após 2h de isquemia, enquanto o infiltrado foi visualizado após 2h de reperfusão. No segmento distante (R12L) foram detectados valores de MPO, mas não se visualizaram neutrófilos. Da mesma maneira, a MPO foi mais elevada nas camadas mucosa e submucosa do jejuno sob DIL, onde sequer foram visualizados neutrófilos. Estes resultados podem ter sido decorrentes da falta de especificidade da MPO em relação à sua produção por neutrófilos e da metodologia utilizada nas amostras deste experimento, a qual foi desenvolvida para avaliar a MPO proveniente de neutrófilos de roedores e não de equinos.

A MPO é uma enzima produzida por neutrófilos ativados, sendo uma medida quantitativa indireta da presença dessas células e, portanto, do infiltrado inflamatório. Normalmente, seu aumento ocorre concomitante com a presença de infiltrado neutrofilico observado na histopatologia (Faleiros, 2003). No entanto, a MPO não é uma enzima específica de neutrófilos, podendo ser decorrente da atividade de eosinófilos e monócitos (Krawisz et al., 1984). No intestino de equinos há número considerável eosinófilos em condições normais e essas células podem ser as principais constituintes do infiltrado inflamatório nas primeiras 24h após injúria intestinal, juntamente com os neutrófilos, contribuindo para o aumento de MPO (McConnico et al., 1999). Na distensão experimental no cólon menor de equinos, observou-se presença elevada de eosinófilos nos tempos basal, após a isquemia e durante a reperfusão, com aumento de neutrófilos apenas após a reperfusão (Faleiros, 2003). Assim sendo, no presente experimento, acredita-se que o aumento da MPO, especialmente nas amostras onde não se visualizou neutrófilos, possa ter tido uma influência predominante de outras células que participam da resposta inflamatória, além dos neutrófilos. Deve-se considerar, mais uma

vez, também que a metodologia de obtenção da MPO nas amostras deste experimento foi padronizada para roedores, não detectando a atividade de macrófagos e eosinófilos para esses animais, o que pode não ser da mesma forma para a espécie equina.

A única alteração que foi semelhante entre os segmentos sob DIL e IVC foi a descamação das células mesoteliais da serosa que, em ambos os segmentos e em todos os grupos aumentou após 2h de isquemia. As células mesoteliais constituem uma camada celular única que recobre a serosa de órgãos peritoneais e são responsáveis pela síntese e liberação do fator de ativação do plasminogênio, o qual libera a plasmina que realiza a fibrinólise peritoneal, evitando as aderências (Thornton e Barbul, 1997). A descamação de células mesoteliais é um achado freqüente após obstruções intestinais, mas também o é pela manipulação cirúrgica (Dabareiner et al., 2001; Faleiros, 2003) e nem sempre sua ocorrência está associada à formação de aderências (Allen et al., 1986). Essa formação pode ser decorrente da inflamação gerada pela isquemia que cursa com aumento da permeabilidade vascular com exsudação serofibrinosa, deposição de fibrina e invasão de fibroblastos (Dabareiner et al., 2001). Apesar do aspecto alterado da serosa do jejuno sob IVC, especialmente após a reperfusão, a deposição de fibrina não foi uma alteração importante nos equinos desse experimento em nenhum dos segmentos e grupos.

5.3.2. Demais órgãos

Para se considerar alterações pulmonares em equinos decorrentes de lesões intestinais, é necessário avaliar a possibilidade de lesão prévia, caracterizada por exsudato bronquiolar e/ou eosinófilos no parênquima (Faleiros, 2003), conforme foi observado em dois equinos do grupo C e em um do grupo T1. As amostras desses animais foram submetidas à análise de MPO, o que contribuiu para os valores elevados de MPO obtidos. No entanto, no grupo T2 não se visualizaram alterações compatíveis com lesões pulmonares prévias citadas por Faleiros (2003) e, apesar do aumento de MPO não ter sido significativo, foi numericamente superior aos demais grupos. Para avaliar os valores de MPO obtidos nas amostras pulmonares dos equinos desse experimento, é necessário considerar

algumas particularidades do órgão e sua resposta às lesões de I/R intestinal.

A presença de neutrófilos no parênquima pulmonar após a I/R intestinal é indicativa de lesão remota (Pinheiro et al., 1999; Faleiros et al., 2008), no entanto, não é uma condição obrigatória para a ativação de neutrófilos no órgão. Tal fato deve-se à particularidade da circulação pulmonar que, diferente de outros órgãos, não necessita realizar o recrutamento dos neutrófilos para o tecido para ativá-los, podendo essas células ser ativadas no interior dos vasos (Wagner e Roth, 2000). Apesar de não terem sido visualizados neutrófilos no parênquima pulmonar na maioria das amostras dos equinos deste experimento, não se pode descartar a possibilidade da reação do órgão à injúria intestinal, uma vez que os valores de MPO foram elevados e semelhantes aos encontrados por Faleiros et al. (2008) que constataram lesão pulmonar decorrente de reperfusão intestinal em equinos. Adicionalmente, considerando que o tecido laminar sofreu lesão é possível considerar que o pulmão, órgão que normalmente sofre lesões à distância primeiro que outros órgãos (Nakagawa et al., 2008), tenha sido acometido. É importante ressaltar também que, nas amostras que possuíam eosinófilos, os valores de MPO foram influenciados por sua presença, mas essas células não estavam presentes nas amostras do grupo T2, onde foi detectada atividade superior de MPO em relação aos demais grupos.

Devido à particularidade do tecido pulmonar quanto ao recrutamento de neutrófilos, alguns pesquisadores, ao estudarem a resposta desse órgão após a I/R intestinal em ratos, consideraram apenas a atividade de MPO para avaliar a resposta inflamatória, não utilizando a histopatologia (Souza et al., 2000). No entanto, esses modelos utilizam o roedor que, diferentemente do equino, possui uma metodologia de mensuração da MPO específica para neutrófilo. Em virtude disso, considera-se fundamental na espécie equina a análise histopatológica associada aos resultados de MPO. De acordo com o exposto e com os resultados de MPO e da histopatologia obtidos nas amostras pulmonares nos equinos deste experimento, considera-se importante avaliar, em experimentos futuros com a espécie, a possibilidade de desenvolvimento de lesões remotas no pulmão sem a presença de neutrófilos

no parênquima, mas com atividade alta de MPO. É importante considerar também, em experimentos futuros, que seja utilizada uma metodologia para avaliação pulmonar antes da obstrução experimental, não somente para descartar a possibilidade de lesões prévias como também avaliar a influência da anestesia inalatória no desenvolvimento de alterações.

Apesar de não ter sido encontrada na literatura valores específicos de MPO para diferentes tecidos, valores de MPO abaixo de 0,1 não são considerados importantes (Souza, 2008, comunicação pessoal). Assim, os valores encontrados nos demais órgãos avaliados neste trabalho além de baixos, não foram acompanhados de infiltrado de neutrófilos ou alterações morfológicas à microscopia óptica. No entanto, o tecido laminar, apesar de apresentar baixa atividade de MPO, foi o único que apresentou lesão à histopatologia em grau discreto (escore 1) em todas as amostras.

Embora tenha sido encontrada lesão no tecido laminar dos eqüinos deste experimento, em nenhum dos animais foram verificadas alterações clínicas compatíveis com laminite, as quais normalmente se desenvolvem quando o grau de lesão tecidual é superior a 1 (Pollitt, 1996). Em pacientes portadores de abdômen agudo de ocorrência natural, a taxa relatada foi de 25% (Belknap e Moore, 1989; Cohen et al., 1994). No entanto, é possível que essa prevalência seja maior, uma vez que poucos estudos reportam a histopatologia do tecido laminar na fase prodrômica da laminite em casos de obstruções intestinais. Os resultados histopatológicos obtidos neste experimento são semelhantes aos encontrados por Rio Tinto (1999) em modelo de obstrução experimental de jejuno em eqüinos.

5.4. Análise ultra-estrutural e medidas das vilosidades

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu observar em detalhes as lesões verificadas na histopatologia, sendo coerentes com os escores observados para a maioria das amostras. Além disso, possibilitou também perceber alterações que não puderam ser visualizadas na microscopia convencional. Tais alterações constituíram principalmente de achatamento e diminuição da rugosidade das vilosidades e ocorreram especialmente em

amostras do segmento sob DIL após 12h de reperfusão, os quais tinham escores para lesão de mucosa igual a zero. As alterações foram coerentes com os resultados obtidos nas medidas das vilosidades realizadas nesses segmentos, onde se encontrou aumento do perímetro em todas as amostras, embora só no grupo C às 12h de reperfusão tenha havido significância, e diminuição do número de vilosidades por mm^2 em todos os grupos, sendo significativa após 12h de reperfusão nos grupos T1 e C. Embora não tenham sido realizadas medidas nos segmentos distantes (R12L), as mesmas características foram observadas na MEV.

A morfologia das vilosidades confere uma maior superfície de absorção, sendo uma adaptação fisiológica importante. Assim, tanto a diminuição da rugosidade quanto o achatamento das vilosidades diminuem a área de absorção intestinal, o que pode ocorrer em situações fisiológicas ou patológicas. O jejum promove a retração das vilosidades e a diminuição de seu tamanho (Dunel-Erb et al., 2001; Mazurais et al., 2007) e no tempo de 12h de reperfusão os animais deste experimento completavam 24h sem se alimentar. A hipomotilidade também causa o mesmo efeito, especialmente quando somada à distensão intraluminal de gás por fermentação bacteriana, sendo um mecanismo de defesa para diminuir a absorção de endotoxinas (Moore, 1992). A retração das vilosidades foi visualizada após obstrução venosa experimental no jejuno de eqüinos (Sullins et al., 1985).

Qualquer um dos fatores supramencionados pode ter contribuído para aumentar o perímetro e diminuir a área e o número de vilosidades por mm^2 às 12h de reperfusão nas amostras deste experimento. É importante considerar também que durante a abertura abdominal para a colheita das amostras intestinais de 12h de reperfusão após a eutanásia dos animais foi observada distensão intraluminal em graus variáveis devido à presença de gás. A possibilidade do aumento das medidas ter sido decorrente de edema foi descartada devido à falta de qualquer alteração compatível à histopatologia.

5.5. Mediadores inflamatórios

Entre os mediadores comumente encontrados nas respostas à injúria isquêmica está, principalmente, o TNF- σ e também o GCP-2,

sintetizados especialmente pelas células endoteliais e epiteliais, monócitos e macrófagos, os quais também podem ser as células-alvo (Land, 1998; Cunha et al., 1988). Neste experimento esses mediadores foram avaliados nas amostras do grupo controle e não nos demais grupos devido aos resultados pouco expressivos encontrados.

A julgar pela metodologia e pelos resultados obtidos no presente experimento, pode-se dizer que o TNF- σ foi detectado, mas que não constituiu um mediador inflamatório de relevância. Na isquemia cerebral em ratos, o TNF- σ foi detectado em dois momentos distintos: de 1 a 3h após a isquemia e de 24 a 36h após a reperusão, motivo pelo qual foi denominado de bifásico (Wang et al., 2007). No entanto, os valores detectáveis de TNF- σ podem ser variáveis de acordo com o tipo de célula e estímulo por ela recebido. De vários mediadores pró-inflamatórios avaliados na enterite experimental induzida por *Salmonella typhimurium* em bezerros, o TNF- σ não aumentou durante as 12h subseqüentes de avaliação, permanecendo semelhante aos valores do segmento controle (Santos et al., 2002). No mesmo experimento, mediadores regulatórios que controlam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o IL-4, aumentaram nas primeiras horas após a inoculação, sendo esse o motivo principal, segundo os autores, para a expressão de TNF- σ de pouca relevância (Santos et al., 2002). Em equinos portadores de afecções intestinais, a mensagem para o TNF- σ foi detectada no soro e líquido peritoneal (Morris et al., 1991; Barton e Collatos, 1999). Em animais com colite parasitária, entre os mediadores pró-inflamatórios avaliados, o TNF- σ foi o que mais variabilidade expressou, mas foi detectado no cólon com infiltrado de neutrófilos (Davidson et al., 2002). No entanto, nesses trabalhos, os autores não informaram o tempo de evolução das afecções.

Considerando os resultados obtidos por outros autores e a resposta da célula do epitélio intestinal à injúria, é possível supor que os valores aqui obtidos para TNF- σ possam ter sido decorrentes da modulação própria da resposta inflamatória intestinal na fase aguda da lesão. As células do epitélio intestinal, ao sofrerem lesão, estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios e também regulatórios. As células

epiteliais são importante fonte de mediadores anti-inflamatórios derivados dos ácidos graxos, onde se destacam os da família das lipoxinas. Essas substâncias retardam o recrutamento de neutrófilos e inibem a produção de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-8. Essa regulação local controla a intensidade da resposta inflamatória, evitando danos teciduais maiores (Blikslager et al., 2007).

O GCP-2 é uma quimiocina da classe CXC que estimula a quimiotaxia e ativação, degranulação e liberação de RLO pelos neutrófilos, os quais produzem metaloproteinases durante a inflamação, contribuindo para a lesão tecidual (Feniger-Barish et al., 2000; Gijsbers et al., 2005). Em células epiteliais bronquiolares humanas, o GCP-2 pode ter sua liberação estimulada por algumas interleucinas pró-inflamatórias (Prause et al., 2003). Em equinos, não foram encontrados estudos quantificando o GCP-2, mas ele foi detectado 1h após a infecção por *Salmonella typhimurium* no intestino de bezerros diminuindo nos tempos subseqüentes, o que foi atribuído à sua modulação por proteínas anti-inflamatórias produzidas concomitantemente (Santos et al., 2000). Pela ausência de dados na literatura e da avaliação de outras citocinas no presente experimento, não se pode afirmar o motivo dos valores de GCP-2 serem semelhantes aos basais em todos os tempos, mas é possível que o mecanismo seja o mesmo que influenciou as baixas concentrações de TNF- σ .

5.6. Tratamentos

5.6.1. Glutamina

No presente estudo, a glutamina foi incluída como tratamento considerando-se seu papel no estresse oxidativo e seu potencial como terapia auxiliar em casos de I/R intestinal em equinos. A glutamina é o principal precursor da glutatona, um agente antioxidante importante, sendo responsável pela manutenção de seus teores durante o estresse oxidativo, situação na qual pode ocorrer sua depleção (Amores-Sánchez e Medina, 1999; Jia et al., 2006). Em equinos submetidos a I/R, o tratamento com glutatona atenuou o infiltrado de polimorfonucleares e diminuiu o edema de submucosa do jejuno (Abreu, 2003).

A ação da glutamina na diminuição da formação e neutralização de RLO tem o potencial de proteger e manter a integridade do epitélio intestinal em situações de I/R, evitando ou atenuando a lesão da mucosa. Adicionalmente, esse nutriente também estimula a proliferação de enterócitos, o que auxilia na recuperação do epitélio intestinal após o estabelecimento da lesão (Blikslager e Roberts, 1997; Thomas et al., 2005). No presente experimento, a glutamina não atenuou as lesões de mucosa após 2h de isquemia e 2h de reperfusão, no entanto, na avaliação da evolução das lesões ao longo do tempo, ocorreu diminuição significativa dos escores para erosão e hemorragia de mucosa. No entanto, comparando-se ao grupo controle, tal diferença não foi significativa, o que pode ter sido decorrente da metodologia utilizada, a qual diferiu da encontrada na literatura consultada.

Em equinos, a glutamina é utilizada como suplemento na dieta de atletas, apesar de reconhecer-se que sua concentração diminui no organismo em casos de infecção (Harris et al., 2006). Nos equinos do presente experimento, optou-se pela administração intravenosa, uma vez que a absorção intestinal é limitada em casos de lesões. Em humanos com afecções intestinais e com ingestão alimentar limitada, a via circulatória é a fonte mais importante de glutamina para o intestino (Elia e Lunn, 1997).

No presente trabalho, utilizou-se a dose de 50mg/Kg, a qual está entre os valores utilizados na suplementação nutricional de equinos atletas (Harris et al., 2006). Nessa forma de suplementação, a concentração plasmática de glutamina eleva-se 1h após a ingestão, sem aumentos subsequentes da amônia plasmática, diminuindo em até 8h. Assim, optou-se pelo fracionamento da dose em dois momentos, com intervalo de seis horas entre ambos, com o objetivo de se manter a concentração plasmática de glutamina constante do início do tratamento até a eutanásia dos animais. No entanto, a dose escolhida não foi eficaz para atenuar as lesões, devendo-se considerar doses maiores para tal finalidade. Na avaliação da glutamina na diminuição da resposta inflamatória pós-parto em bovinos leiteiros, as doses utilizadas foram 159 e 319mg/Kg/IV tendo ambas igual eficácia (Jafari et al., 2006).

Além da dose utilizada, outro fator que pode ter colaborado para os resultados acima expostos foi o modo de administração da glutamina, a qual diferiu da metodologia utilizada nos experimentos de isquemia e reperfusão na literatura consultada. Nesses experimentos, a administração foi realizada de 3 a 72h antes da isquemia em infusão intravenosa contínua (Harward et al., 1994; Jia et al., 2006; Szijártó et al., 2007). Essa metodologia é impraticável em casos de equinos com cólica, uma vez que seria necessário prever sua ocorrência para iniciar o tratamento com a glutamina. No entanto, é pertinente considerar que a metodologia utilizada no presente experimento pudesse ter sido a de infusão contínua, mesmo após o estabelecimento da isquemia e sugere-se que essa metodologia seja utilizada, juntamente com doses superiores, em experimentos futuros com equinos submetidos ao mesmo modelo experimental.

A mucosa intestinal utiliza grande parte da glutamina circulante, aumentando intensamente sua demanda em situações de estresse oxidativo ou inflamatório (Fuchs e Bode, 2006). Porém, como o intestino é incapaz de armazenar esse nutriente, depende das quantidades presentes na corrente circulatória ou na dieta. Adicionalmente, a glutamina é um dos constituintes do muco, além de atuar no co-transporte de líquidos no intestino (Elia e Lunn, 1997), o que a torna uma substância com potencial benéfico no tratamento de lesões intestinais decorrentes isquemia e reperfusão. Assim, ao se avaliar a tendência de reparo mais precoce observada nos equinos deste experimento, considera-se a glutamina como um possível potencial terapêutico em casos de isquemia e reperfusão intestinal para a espécie.

5.6.2. Associação de succinato sódico de hidrocortisona, pentoxifilina, ácido ascórbico e dimetilsulfóxido

Os fármacos escolhidos para constituir o tratamento do grupo T2, devido a suas diferentes e complementares ações terapêuticas multimodais, quando utilizados em associação, teriam o potencial de atenuar as lesões intestinais tanto durante a isquemia quanto na reperfusão. Nos equinos deste experimento, apesar da diminuição significativa da erosão e hemorragia de mucosa após 12h de reperfusão no grupo T2, essa redução não teve diferença significativa em

relação ao grupo controle. A maioria dos fármacos utilizados na associação foram avaliados em modelos experimentais de obstrução em eqüinos isoladamente e, em sua maioria, com resultados limitados. Assim, é pertinente considerar alguns aspectos relativos aos fármacos e metodologia utilizados nos eqüinos deste experimento comparando-os com os resultados obtidos na literatura consultada.

O SSH foi utilizado na mesma dose e metodologia utilizada em modelos experimentais semelhantes de IVC, onde o principal efeito foi contribuir para o reparo precoce da mucosa após 12h de reperfusão (Rio Tinto, 1999). Apesar de não haver diferença estatística entre grupos nos eqüinos deste experimento, houve uma diferença de 1,5 entre os escores médios de lesão em relação ao grupo C, o que demonstrou uma tendência de reparo mais precoce.

O DMSO na dose utilizada nos eqüinos deste experimento não havia sido testado em modelos de obstrução completa no intestino, mas foi benéfico em isquemia de baixo fluxo de jejuno em eqüinos, onde diminuiu a permeabilidade microvascular, o edema e o infiltrado de neutrófilos (Dabareiner et al., 2005). No entanto, os autores administraram o fármaco diretamente na artéria mesentérica ao final da obstrução, fato que pode ter colaborado para uma melhor distribuição do fármaco no tecido isquêmico. Adicionalmente, o modelo experimental utilizado por esses autores não provoca danos tão graves à microvasculatura e a mucosa como o utilizado neste experimento, fato que pode também ter prejudicado a distribuição do fármaco no tecido na metodologia deste trabalho. O DMSO, em doses superiores, não foi eficaz na atenuação de lesões de mucosa em obstruções completas de jejuno (Arden et al., 1990; Horne et al., 1994), mas contribuiu, juntamente com os outros constituintes da associação, para o reparo mais precoce da mucosa nos eqüinos deste experimento. Adicionalmente, seu uso é consagrado em casos de eqüinos com cólica, sendo indicado por diversos autores no pós-operatório de eqüinos portadores de obstruções intestinais (Moore e Bertone, 1992; White, 2006; Rowe e White, 2006), além de ser benéfico na redução de aderências (Sullins et al., 2004).

A PTX atenuou a hemorragia de mucosa e colaborou para a recuperação mais precoce da

mucosa após 12h de reperfusão em jejuno sob IVC em um experimento anterior conduzido por Abreu (2003). Tais resultados foram semelhantes quando comparados aos encontrados ao longo do tempo dentro do grupo T2 nos eqüinos deste experimento. No entanto, a metodologia aqui utilizada diferiu da realizada por Abreu (2003), pois neste experimento se objetivava o uso da PTX em associação, sendo escolhida a administração em bolus para melhor padronizar o tratamento. Abreu (2003) utilizou a dose de 7,5mg/Kg 5min antes do final da obstrução seguida de infusão de 3mg/Kg/h durante a primeira hora de reperfusão, administrando uma dose superior a utilizada nos eqüinos deste experimento. A dose aqui utilizada foi parcialmente eficaz em um experimento anterior, na diminuição da produção de citocinas geradas pela endotoxemia induzida em eqüinos (Baskett et al., 1997). No entanto, foi administrada minutos antes da infusão de endotoxina, ou seja, antes do estabelecimento das lesões, o que pode ter colaborado para os resultados.

Não se conhece estudos avaliando do ácido ascórbico (AA) em obstruções intestinais em eqüinos. Em um modelo de isquemia arterial de jejuno em coelhos, metade da dose de AA foi administrada ao final de 3h da isquemia e a outra metade nos 15 primeiros minutos de 1h da reperfusão por via intravenosa. Apesar das lesões de mucosa estabelecidas na isquemia não terem sido atenuadas, o edema e hemorragia da submucosa diminuíram (Byrka-Onczarek et al., 2004). No entanto, nesse experimento a dose utilizada, 250mg/Kg, foi 2,5 vezes mais alta que a dose terapêutica recomendada para a espécie (Plumb, 2002). A dose utilizada no presente experimento foi a dose terapêutica recomendada para eqüinos, sendo difícil inferir se esta foi baixa para a finalidade desejada.

Independente das diferenças metodológicas supracitadas, é pertinente considerar que a falta de diferença significativa entre os grupos T2 e o controle possa ter sido decorrente de outros fatores, entre os quais se consideram o momento da administração, o grau de lesão tecidual e a distribuição limitada dos fármacos no tecido lesionado.

A administração da associação de agentes constituintes da terapia multimodal 1h após o início da isquemia teve o objetivo de testar o

tratamento mimetizando situações clínicas reais, onde os animais são atendidos após o desenvolvimento das lesões. No entanto, é possível que o dano tecidual tenha sido de tal magnitude que possa ter prejudicado a distribuição e/ou efeito dos fármacos nos tecidos. A hipóxia gerada pelas obstruções, juntamente com os mediadores inflamatórios produzidos, tem o potencial de danificar o endotélio, situação que, a julgar pela presença acentuada de hemorragia e edema em todos os tempos e em todos os grupos, ocorreu nos equinos deste experimento. Tal situação pode ter colaborado para uma distribuição inadequada ou heterogênea dos fármacos no intestino lesionado, ocasionando concentrações terapêuticas insuficientes no tecido. Embora não tenham sido encontrados estudos quantificando seu prejuízo na perfusão tecidual, Freeman et al. (1989), avaliando lesões decorrentes de IVC em jejuno de equinos, observaram pulsação arterial menor durante a reperfusão, o que foi atribuído ao edema e hemorragia acentuados. Tais situações podem gerar uma obstrução parcial mecânica por compressão arterial direta e, assim, juntamente com a lesão endotelial, também contribuir para uma perfusão inadequada no período de reperfusão. Adicionalmente, considerando-se a hemorragia visualizada na serosa e mesentério no jejuno sob IVC, não se pode descartar também a possibilidade da obstrução vascular em decorrência de microtrombos formados durante a isquemia, o que também pode ter colaborado para uma inadequada perfusão após a desobstrução intestinal.

Outro fator que pode ter contribuído para uma perfusão inadequada durante a reperfusão e, assim, a distribuição dos fármacos no tecido lesionado, foram as alterações hemodinâmicas observadas nos equinos deste experimento ao final do período de obstrução. Apesar de a pressão arterial ter sido mantida dentro do desejável durante o período de anestesia, a fluidoterapia permaneceu na mesma taxa de infusão e não foi instituída durante o período pós-anestésico, momento no qual também a infusão de dobutamina foi interrompida. A partir desse momento, é razoável supor que os equinos tenham permanecido hipotensos até o final das 12h de reperfusão. A hipovolemia sistêmica contribui para a hipoperfusão de tecidos como o intestino e, dessa maneira, pode ter colaborado também para que a eficácia dos fármacos

utilizados nos grupos T1 e T2 não tenha diferido significativamente do grupo C. A fluidoterapia é uma parte fundamental da terapêutica de equinos com cólica, o que contribui para a adequada perfusão intestinal e sua recuperação mais precoce (White, 2006).

5.7. Considerações sobre o desenvolvimento das lesões teciduais decorrentes das obstruções intestinais e sua terapêutica em equinos

Normalmente, os artigos que discutem sobre a gênese das lesões de I/R e sua terapêutica no equino enfatizam principalmente a ação dos RLO e fármacos que possam neutralizá-los (Blikslager et al., 1997; Moore, 1997). No entanto, pouco se discorre a respeito dos outros mecanismos responsáveis pela lesão tecidual. Apesar de o equino converter a XDH em XO durante a isquemia, muitas terapias somente a base de antioxidantes foram ineficientes, sendo já observado que 180min de isquemia venosa no jejuno pode gerar o mesmo grau de lesão que 90min de isquemia venosa seguidos de 90min de reperfusão (Law e Freeman, 1995), o que sugere que a isquemia é tão importante quanto a reperfusão no desenvolvimento das lesões na espécie. De fato, evitar que a lesão ocorra é praticamente impossível, uma vez que a isquemia é comprovadamente suficiente para, em equinos, provocar lesões importantes no intestino obstruído. Nos equinos do presente experimento, esse fato foi comprovado nas lesões de mucosa, na hemorragia e edema que foram significativos na isquemia, com valores semelhantes à reperfusão. Nesse contexto, as células endoteliais, as células epiteliais e os polimorfonucleares são constituintes importantes no desenvolvimento das lesões durante o período isquêmico, sendo, basicamente, ativados pelas concentrações baixas de oxigênio no tecido.

De todos os trabalhos consultados na literatura que testaram tratamentos das lesões após o estabelecimento da isquemia, nenhum foi capaz de reduzir a lesão da mucosa nas obstruções intestinais completas. As células epiteliais são bastante sensíveis à hipóxia e recebem uma circulação terminal por onde a perfusão até a extremidade das vilosidades é deficiente (Blikslager et al., 2007). Essa característica pode dificultar, inclusive, a chegada do fármaco até essas células. No entanto, não se pode

desconsiderar a lesão endotelial que ocorre, a qual também pode contribuir para o mesmo efeito. Talvez essa possibilidade se justifique quando se considera os resultados satisfatórios em obstruções completas com o tratamento intraluminal e tópico ou administração na artéria mesentérica de uma associação de agentes terapêuticos constituintes da “Carolina Rinse” (Dabareiner et al., 2003). O uso local em obstruções parciais facilita a chegada do agente no local lesionado, contribuindo para a atenuação e recuperação mais precoce das lesões intestinais. No entanto, seu uso é de pouca aplicabilidade clínica, especialmente em lesões intestinais extensas.

Apesar dos tratamentos utilizados nos equinos deste experimento não terem diferido estatisticamente do grupo controle, houve progressão na resolução da erosão e hemorragia de mucosa após 12h de reperfusão. Tal resultado pode ter sido decorrente, além da metodologia utilizada, das alterações hemodinâmicas e da microvasculatura intestinal, o que pode ter dificultado a perfusão dos agentes terapêuticos no tecido lesionado. Sem dúvida, tal situação, inclusive, seja um fator adicional importante para o insucesso de muitas terapias testadas em vários experimentos em equinos sob modelos experimentais semelhantes aos aqui utilizados.

6. CONCLUSÕES

Nas condições de condução deste experimento e com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- No modelo de isquemia venosa completa por 2h seguida de 2h de reperfusão em jejuno de equinos, as lesões de mucosa iniciam durante a isquemia;
- O TNF- σ e o GCP-2 não constituem mediadores com sensibilidade adequada para avaliar a intensidade da resposta inflamatória na fase aguda da isquemia e reperfusão em jejuno submetido à isquemia venosa completa e distensão intraluminal por 2h, seguidas de 12h de reperfusão de equinos;
- A glutamina, na dose de 50mg/Kg contribui para a regeneração mais precoce da mucosa e a atenuação da hemorragia na avaliação dessas lesões ao longo do tempo em lesões decorrentes

de isquemia e reperfusão de jejuno sob isquemia venosa completa em equinos;

- A associação de succinato sódico de hidrocortisona na dose de 4mg/Kg, ácido ascórbico na dose de 50mg/Kg, dimetilsulfóxido na dose de 20mg/Kg e pentoxifilina na dose de 8mg/Kg contribui para a regeneração mais precoce da mucosa e a atenuação da hemorragia na avaliação dessas lesões ao longo do tempo em lesões em isquemia e reperfusão de jejuno sob isquemia venosa completa em equinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.M.G. Apoptose e efeitos da pentoxifilina, da glutatona e do ozônio no jejuno de equinos sob isquemia, congestão e reperfusão. 2003. 91f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- AMORES-SÁNCHEZ, M.I.; MEDINA, M.A. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol. Gen. Metab.*, v. 67, p. 100-105, 1999.
- ALLEN, D.; WHITE, N.A.; TYLER, D.E. Factors for prognostic use in equine obstructive small intestine disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 189, p. 777-780, 1986.
- ALLEN, D.; TYLER, D.E. Pathophysiology of acute abdominal diseases. In: WHITE II, N.A. *Equine Acute Abdomen*. Philadelphia: Lea & Febiger., 1990. Cap.3. p. 65-88.
- ARDEN, W.A.; SLOCOMBE, R.F.; STICK, J.A. Morphologic and ultrastructural evaluation of effect of ischemia and dimethyl sulfoxide on equine jejunum. *Am. J. Vet. Res.*, v. 51, p. 1784-1791, 1990.
- ASLAN, A.; KARAGUZEL, G.; CELIK, M. et al. Pentoxifyline contributes to the hepatic cytoprotective process in rats undergoing hepatic ischemia and reperfusion injury. *Eur. Surg. Res.*, v. 33, p. 285-290, 2001.
- ATHERTON, R.P.; FURR, M. Endotoxin release after antimicrobial treatment in sick foals is mediated by antimicrobial class. *J. Equine Vet. Sc.*, v. 26, p. 356-359, 2006.

- BARTON, M.H.; COLLATOS, C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 13, p. 457-64, 1999.
- BASKETT, A.; BARTON, M.H.; NORTON, N. et al. Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 58, p. 1291-1299, 1997.
- BELKNAP, J.K.; MOORE, J.N. Evaluation of heparin for prophylaxis of equine laminitis: 71 cases (1980-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 195, p. 505-507, 1989.
- BELKNAP, J.K.; GIGUÈRE, S.; PETTIGREW, A. et al. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage at the onset of lameness: innate vs. adaptive immune response. *Equine Vet. J.*, v. 39, p. 42-47, 2007.
- BELLHORN, T.; MACINTIRE, D.K. Bacterial translocation. *Comp. Cont. Vet. Educ.*, v. p. 229-234, 2004.
- BLIKSLAGER, A.T.; BRISTOL, D.G.; RHOADS, J.M. et al. Glutamine and transforming growth factor alpha synergistically enhance intestinal repair following intestinal ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, v. 110, p. 313, 1995.
- BLIKSLANGER, A.T.; ROBERTS, M.C.; GERARD, M.P. et al. How important is intestinal reperfusion injury in horses? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 211, p. 1387-1389, 1997.
- BLIKSLAGER, A.T.; ROBERTS, M.C. Mechanisms of intestinal mucosal repair. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 211, p. 1437-1441, 1997.
- BLIKSLAGER, A.T.; MOESER, A.J.; GOOKIN, J.L. et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 545-564, 2007.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.*, v. 76, p. 61-90, 1986.
- BRYANT, C.E. Equine sepsis and endotoxemia: other toll-like receptors, the role of cyclooxygenase and future therapeutic developments. In: 8th WORLD CONGRESS OF VETERINARY ANESTHESIA, 2003, Knoxville. *Anais ...* Knoxville: University of Tennessee, 2003. p. 83-85.
- BYRKA-OWCZAREK, K.; STEPLEWSKA-MAZUR, K. KRASON, M. et al. The evaluation of the protective action of antioxidants on small intestine of rabbits experimentally injured by ischemia and reperfusion. *J. Ped. Surg.*, v. 39, p. 1226-1229, 2004.
- CHADE, A.R.; RODRIGUEZ-PORCEL, M.; HERRMANN, J. et al. Beneficial effects of antioxidant vitamins on the stenotic kidney. *Hypertension*, v. 42, p. 605-612, 2003.
- COHEN, N.D.; PARSON, E.M.; SEAHORN, T.L. et al. Prevalence and factors associated with development of laminitis in horses with duodenitis/proximal jejunitis: 33 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 204, p. 250-254, 1994.
- COOPER, G.M. Signaling molecules and their receptors. In: _____. *The Cell: a molecular approach*. 2ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 2000a. Disponível <<http://www.ncbi.nih.gov/books>>. Acesso em: 29 julh.2007.
- COOPER, G.M. Regulation of programmed cell death. In: _____. *The Cell: a molecular approach*. 2ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 2000b. Disponível <<http://www.ncbi.nih.gov/books>>. Acesso em: 29 julh.2007.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Cellular injury and cellular death. In: _____. *Robins pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, 1994. Cap. 1, p. 1-34.
- CUNHA, F.Q.; HELUY-NETO, N.E.; KLEIN, A. et al. Failure of PAF-acether to induce *in vivo* neutrophil migration. *Agents and Actions*, v. 25, p. 191, 1988.
- DABAREINER, R. M.; SULLINS, K. E.; SNYDER, J. R. et al. Evaluation of the microcirculation of equine small intestine after intraluminal distention and subsequent decompression. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p. 1673-1682, 1993.

- DABAREINER, R. M.; SULLINS, K. E.; WHITE, N. A. et al. Serosal injury in the equine jejunum and ascending colon after ischemia-reperfusion or intraluminal distention and decompression. *Vet. Surg.*, v. 30, p. 114-125, 2001.
- DABAREINER, R.M.; WHITE II, N.A.; DONALDSON, L. Evaluation of Carolina Rinse solution as a treatment for ischaemia reperfusion of the equine jejunum. *Equine Vet. J.*, v. 35, p. 642-646, 2003.
- DABAREINER, R.M.; WHITE, N.A.; SNYDER, J.R. et al. Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion. *Am. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 525-536, 2005.
- DAVIDSON, A.J.; EDWARDS, G.B.; PROUDMAN, C.J. et al. Cytocine mRNA expression pattern in horses with large intestinal disease. *Res. Vet. Sc.*, v. 72, p. 177-185, 2002.
- DUNEL-ERB, S.; CHEVALIER, C.; LAURENT, P. et al. Restoration of jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comparative Bioch. Phys.*, v. 129, p. 933-947, 2001.
- ELIA, M.; LUNN, P.G.. The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. *Nutrition*, v.13, p.743-747, 1997.
- ELNER, V.M.; STRITER, R.M.; ELNER, S.G. et al. Neutrophil chemotatic factor (IL-8) gene expression by cytokine-treated retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Pathol.*, v. 136, n. 4, p. 745-750, 1990.
- FALEIROS, R.R. Isquemia e reperfusão experimental no cólon menor de eqüinos. 1997. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FALEIROS R.R. Obstrução experimental do cólon menor eqüino: aspectos clínicos, patológicos e terapêuticos. 2003. 253f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; ALVES, G.E.S et al. Local and remote lesions in horses subjected to small colon distention and decompression. *Can. J. Vet. Res.*, v. 72, p. 68-76, 2008.
- FALLER, D. V. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Cl. Exp. Pharm. Phys.*, v. 26, p. 74-84, 1999.
- FENIGER-BARISH, R.; BELKIN, D.; ZASLAVER, A. et al. GCP-2-induced internalization of IL-8 receptors: hierarchical relationships between GCP-2 and other ELR⁺-CXC chemokines and mechanisms regulating CXR2 internalization and recycling. *Blood*, v. 95, 2000.
- FLAHERTY, J. T.; WEISFELDT, M. L.; Reperfusion injury. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 5, p. 409-419, 1988.
- FREEMAN, D. E.; CIMPRICH, R. E.; RICHARDSON, D. W. et al. Early mucosal healing and chronic changes in pony jejunum after various types of strangulation obstruction. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p.810-818, 1988.
- FUCHS, B.C.; BODE, B.P. Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. *J. Surg. Res.*, v. 131, p. 26-40, 2006.
- GIJSBERS, K.; GOUWY, M.; STRUYF, S. et al. GCP-2/CXCL6 synergizes with other endothelial cell-derived chemokines in neutrophil mobilization and is associated with angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Exp. Cell Res.*, v. 303, p. 331-342, 2005.
- GRANGER, D. N. SENNETT, M.; McELEARNEY, P. et al. Effect of local arterial hypotension on cat intestinal permeability. *Gastroenterology*, v. 79, p. 474-480, 1980.
- HARRIS, R.C., HARRIS P.A., ROUTLEDGE N.B.H., et al. Plasma glutamine concentrations in the horse following feeding and oral glutamine supplementation. *Equine Ve. J. Suppl.*, v.36, p. 637-642, 2006.
- HARWARD, T.R.S., DOUGLAS, C., SOUBA W.W., et al. Glutamine preserves gut glutathione

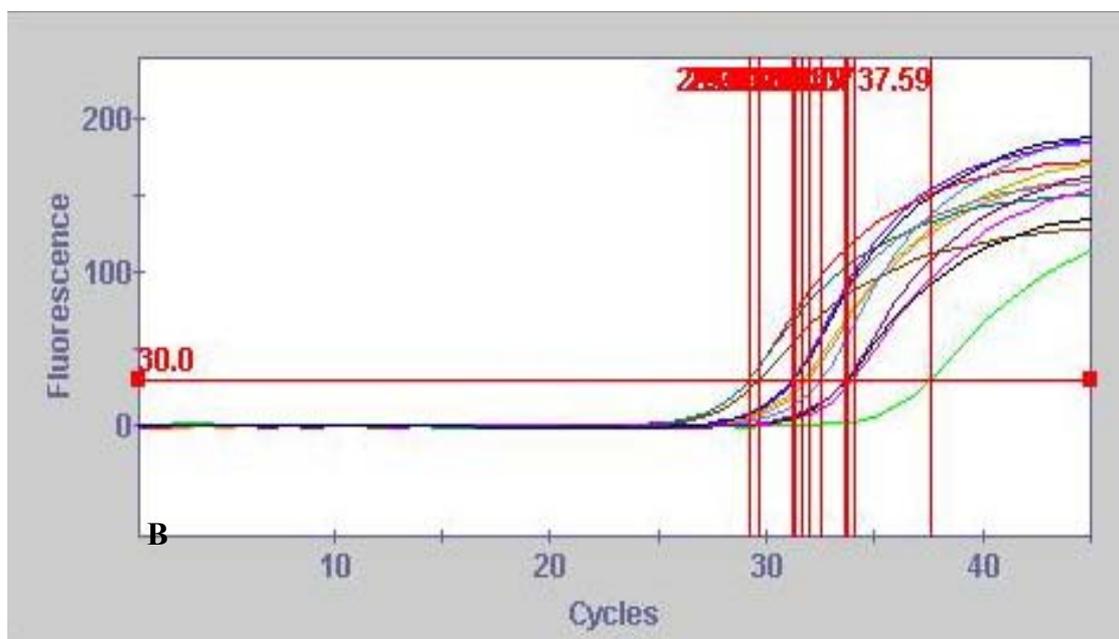
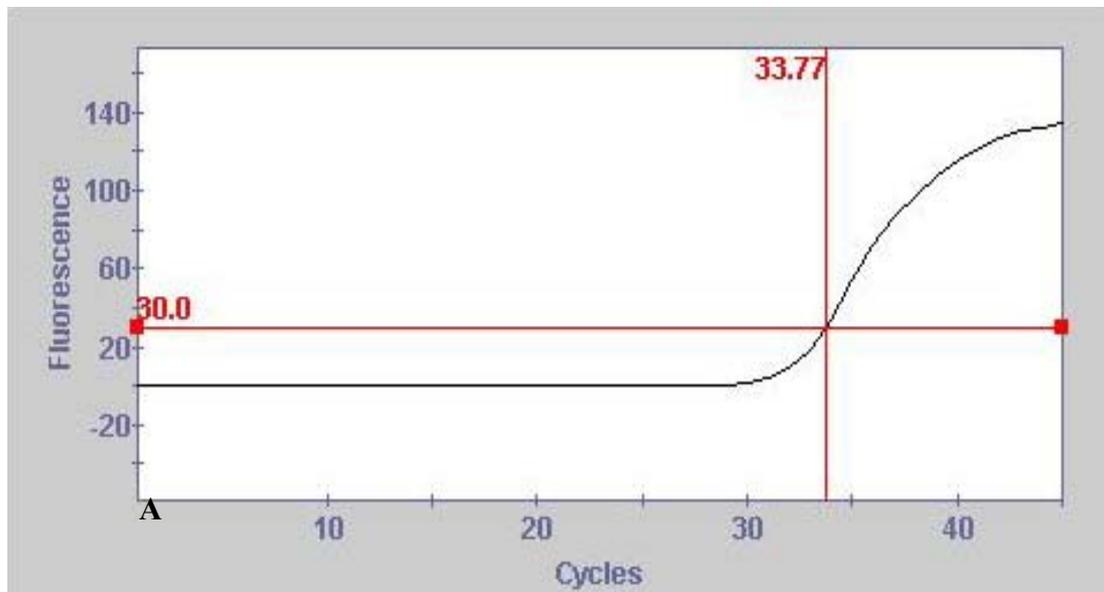
- levels during intestinal ischemia/reperfusion. *J. Surg. Res.* v. 56, p. 351, 1994.
- HORNE, M. M.; PASCOE, P. J.; DUCHARME, P. G. et al. Attempts to modify reperfusion injury of equine jejunal mucosa using dimethylsulfoxide, allopurinol, and intraluminal oxygen. *Vet. Surg.*, v.23, p. 241-249, 1994.
- JAFARI A., EMMANUEL D.G.V., CHRISTOPHERSON R.J., et al. Parenteral administration of glutamine modulates acute phase response in postparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* v. 89, p. 4660-4668, 2006.
- JIA C.J., DAI C.L., ZANG X. et al. Alanine-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *World J. Gastroenterol.*, v. 12, p. 1373-1378, 2006.
- JOHNSTON, J.K.; FREEMAN, D.E.; GILLETTE, D. et al. Effects of superoxide dismutase on injury induced by anoxia and reoxygenation in equine small intestine in vitro. *Am. J. Vet. Res.*, v 52, p. 2050-2054, 1991.
- JOHNSON, G.B.; BRUNN, G.J.; PLATT, J.L. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* v. 172, p. 20-24, 2004.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Inflamação e reparo. In: _____. *Patologia Veterinária*. 6.ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 5, p. 119-165.
- KRAWISZ, J.E., SHARON P., STENSON W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*, v. 87, p.1344-1350, 1984.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am. J. Physiol.*, v. 259, p. 859-864, 1990.
- LAND, W. Postischemic reperfusion injury and cytokines. *Transpl. Proc.*, v. 30, p. 4237-4238, 1998.
- LAW, E.G.; FREEMAN, D.E. Significance of reperfusion injury after venous strangulation obstruction of equine jejunum. *J. Invest. Surg.*, v. 8, p. 263-270, 1995.
- LEE, J.; SON, H.; KIM, M. Attenuation of ischemia-reperfusion injury by ascorbic acid in the canine renal transplantation. *J. Vet. Sci.*, v. 7, p. 375-379, 2006.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantification PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Method*, v. 25, p. 402-405, 2001.
- LODISH, H.; BERKI, A.; ZIPURSKY, S.L. et al. General principles of cell communication. In: _____. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman & Co. 2000. Disponível <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>. Acesso em 10 julh. 2007
- LOPES-PAULO F. Efeitos da glutamina sobre a parede intestinal e sua aplicabilidade potencial em coloproctologia. *Rev. Bras. Coloproct.*, v. 25, p. 75-78, 2005.
- LÖSCHER, W.; JAESCHKE, G.; KELLER, H. Pharmacokinetics of ascorbic acid in horses. *Equine Vet. J.*, v. 16, p. 59-65, 1984.
- LOVE, D.N.; ROSE, R.J.; MARTIN, C.A. et al. Serum concentrations of penicillin in the horse after administration of a variety of penicillin preparations. *Equine Vet. J.*, v. 15, p. 43-48, 1983.
- MACFIE, J. Enteral versus parenteral nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition*, v. 16, p. 606-611, 2000.
- MACKAY, R.J. Vascular endothelial changes leading to SIRS and MODS. In: 8th WORLD CONGRESS OF VETERINARY ANESTHESIA, 2003, Knoxville. *Anais ...* Knoxville: University of Tennessee, 2003. p. 87-89.
- MANDEL, G.L. Cytocines, phagocytes and pentoxifylyne. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 25, p. S20, 1995.
- MAZURAS, D.; ROMÉ, V.; CAHU, A. et al. Fasting and refeeding impacts on piglet jejunal

- transcriptone during weaning period. *Livestock Science*, v. 108, p. 13-16, 2007.
- McCONNICO R.S., WEINSTOCK D., POSTON M.E. et al. Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 60, p. 807-813, 1999.
- MICHIELS, C.; ARNOULD, T.; REMACLE, J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions – review. *Biochim. Bioph. Acta Mol. Cell Res.*, v. 1497, p. 1-10, 2000.
- MOORE, R.M. Pathophysiology of intestinal ischemia and endotoxemia. *Equine Pract.*, v.14, p. 13-15, 1992.
- MOORE, R.M.; BERTONE, A.L. Perioperative medical therapy for ischemia in horses. *Comp. Cont. Educ. Vet. Pract.*, v. 14, p. 1514-1522, 1992.
- MOORE, R. M.; BERTONE, A. L., BAILEY, M. Q. et al. Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am. J. Vet. Res.*, v. 55, p. 1454-1463, 1994.
- MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. *J. Vet. Int. Med.*, v. 9, p. 115-132, 1995.
- MOORE, R. M. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.211, p. 1362- 1366, 1997.
- MOORE, R.M.; BARTON, M.H. An update on endotoxaemia Part 1: mechanisms and pathways. *Equine Vet. Educ.*, v. 10, p. 300-306, 1998.
- MOORE, J.N. Advances in our knowledge of endotoxemia. In: 8th WORLD CONGRESS OF VETERINARY ANESTHESIA, 2003, Knoxville. *Anais ... Knoxville: University of Tennessee*, 2003. p. 77-81.
- MORRIS, D. D.; MOORE, J. N.; CROWE, N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, p. 1565-1569, 1991.
- MUIR, W. W., HUBBEL, J. A. E. *Equine anesthesia: monitoring and emergency therapy*. St. Louis: Mosby, 1991. p. 247-281.
- MURPHY, C.G.; CHEN G.; WINTER D.C. et al. Glutamine preconditioning protects against tourniquet-induced and distant organ injury in a rodent ischemia-reperfusion model. *Acta Orthopaedica*, v.78, p. 559-566, 2007
- NAKAGAWA, H.; TSUNOOKA, N.; YAMAMOTO, N. Intestinal ischemia/reperfusion induced bacterial translocation and lung injury in atherosclerotic rats with hypoadiponectinemia. *Surgery*. Article in press, 2008.
- OGAWA, S.; GERLACH, H.; ESPOSITO, C. et al. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. *J. Clin. Invest.*, v. 85, p. 1090-1098, 1990.
- OMATA, J.; FUKATSU, M.D.; UENO C. et al. Intraluminal glutamine administration during ischemia worsens survival after gut ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res.*, v.143, p. 260-264, 2007.
- OTAMIRI, T.; FRANZÉN, L.; LINDMARK, D.; TAGESSON, C. Increased phospholipase activity in the small intestinal mucosa after ischaemia and revascularization. *Gut*, v. 28, p. 1445-1453, 1987.
- OTAMIRI, T.; LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Phospholipase A₂ inhibition prevents mucosal damage with small intestinal ischaemia in rats. *Gut*, v. 29, p. 489-494, 1988.
- PAPATHANASSOGLU, E.D.E.; MOYNIHAN, J.A.; ACKERMAN, M.H. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit. Care Med.* v. 28, p. 537-550, 2000.
- PENG, X.; YAN, H.; YOU Z., WANG P. & WANG S. Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients. *Burns*, v. 30, p.135-139. 2004.

- PINHEIRO, B.V.; HOLANDA, M. A.; ARAÚJO, F.G. et al. Lesão pulmonar de reperfusão. *J. Pneumol.*, v. 25, p. 124-136, 1999.
- PLUMB, D.C. *Veterinary drug handbook*. 4 ed. St Paul: Iowa State Press, 2002. 993p.
- POLLITT, C.C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Vet. J.*, v.28, p. 38-46, 1996.
- POLLITT, C.C. Laminitis theory – shots around the target. In: X CONGRESSO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO DOS MÉDICOS VETERINÁRIOS ESPECIALIZADOS EM EQUÍNOS, 2007, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2007. CD-ROOM.
- PRAUSE, O.; LAAN, M.; LÖTVALL, J. et al. Pharmacological modulation of interleukin-17 induced GCP-2, GRO- σ and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, v.462, p. 193-198, 2003.
- PRICHARD, M.; DUCHARME, N.G.; WILKINS, P.A. et al. Xantine oxidase formation during experimental ischemia of the equine small intestine. *Can. J. Vet. Res.*, v. 55, p. 310-314, 1991.
- REFFELMAN, T.; HALE, S.L.; DOW, J. S. et al. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *J. Am. Heart Assoc.*, v. 108, p. 2911-2917, 2003.
- RIO TINTO, J. J. Lesões de isquemia e reperfusão experimentais no jejuno de eqüinos: tratamento com succinato sódico de hidrocortisona. 1999. 82f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RIO TINTO, J. J.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS R. R. et al. Lesões de isquemia e reperfusão no intestino de eqüinos: fisiopatologia e terapêutica. *Ciência Rural*, v. 30, p. 1083-1093, 2000.
- ROBERTSON, C.M.; COOPERSMITH, C.M. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 1382-1389, 2006.
- ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. *Clin. Tech. Equine Pract.*, v.1, p. 148-162, 2002.
- RUGGLES, A. J.; FREEMAN, D. E.; ACLAND, H. M. et al. Changes in fluid composition on the serosal surface of jejunum and small colon subjected to venous strangulation obstruction in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, p. 333-340, 1993.
- SAMPAIO, I.B.M. Delineamento em blocos ao acaso. In: _____ . *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Editora FEP-MZV, Belo Horizonte, p. 50-60, 1998.
- SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M. et al. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.*, v. 39, p. 200-215, 2002.
- SCHRÖEDER, J.M.; CRISTOPHER, E. Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells. *J. Immunol.*, v. 142, p. 244-251, 1989.
- SNYDER, J.; PASCOE, J.; HIETALA, S. et al. Gentamicin tissue concentration in equine small intestine and large colon. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1092-1095, 1986.
- SPEIRS, V.C.. The alimentary tract, p. 261-298. In: _____ . *Clinical Examination of Horses*. W.B. Saunders, Philadelphia. 1995.
- SOUZA, D.G.; COUTINHO, S.F.; SILVEIRA, M.R. et al. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 403, p. 121-128, 2000.
- SOUZA, D.G.; VIEIRA, A.T.; SOARES, A.C. et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J. Immunol.*, v. 173, p. 4137-4146, 2004.

- SOUZA, D.G.. (Comunicação pessoal, 2008). Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- STEINBERG, S.M. Bacterial translocation: what it is and what it is not. *Am. J. Surg.*, v. 186, p. 301-305, 2003.
- SULLINS, K.E.; STASHAK, T.S.; MERO, K.N. Pathologic changes associated with induced small intestinal strangulation obstruction and nonstrangulating infarction in horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, p. 913-916, 1985.
- SULLINS, K.E.; WHITE, N.A.; LUNDIN, C.S. et al. Prevention of ischaemia-induced small intestinal adhesions in foals. *Equine Vet. J.*, v. 36, p. 370-375, 2004.
- SZIJÁRTÓ, A.; HAHN, O.; BATMUNKH, E.; et al. Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats. *Clin. Nutr.*, v. 26, p. 640-648, 2007.
- TAGESSON, C.; FRANZÉN, L.; DAHL, G.; WESTRÖM, B. Lysophosphatidilcoline increases rat ileal permeability to macromolecules. *Gut*, v. 26, p. 369-377, 1985.
- THOMAS, S.; PRABHU, R.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Surgical manipulation of the intestine and distant organ damage – protection by oral glutamine supplementation. *Surgery*, v.37, p. 48-55, 2005.
- THORTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg. Clin. North Am.*, v. 77, p. 549-573, 1997.
- VAN HOOGMED, L.M.; SNYDER, J.R.; NIETO, J. et al. In vitro evaluation of a customized solution for use in attenuating effects of ischemia and reperfusion in the equine small intestine. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, p 1679-1686, 2001.
- VAN HOOGMED, L.M.; NIETO, J.E, SNYDER, J.R. et al. In vitro evaluation of an intraluminal solution to attenuate effects of ischemia and reperfusion in the small intestine of horses. *Am. J. Vet. Res.*, v. 63, p. 1389-94, 2002.
- VASCONCELOS, A.C. Alterações circulatórias: trombose, embolia, isquemia, lesões de reperfusão e infarto. In: Curso de Patologia Geral. *Notas de aula*. Belo Horizonte: ICB-UFMG, 2002.
- WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.*, v. 52, p. 349-374, 2000.
- WANG, Q.; TANG, X.N.; YENARI, M.A. The inflammatory response in stroke. *J. Neuroim.*, v. 184, p.53-68, 2007.
- WASA, M.; SOH, H.; SHIMIZU, Y. et al. Glutamine stimulates amino acid transport during ischemia-reperfusion in human intestinal epithelial cells. *J. Surg. Res.*, v. 123, p. 75-81, 2005.
- WHITE, N.A. Epidemiology and etiology of colic In: _____. *The Equine Acute Abdomen*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. Cap. 2. p. 49-64.
- WHITE, N.A. Conditions of the small intestine. *Equine Prac.*, v. 14, p. 16-21, 1992
- WHITE, N.A. Treatments for colic. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 2006, San Antonio. *Anais...* San Antonio, 2006. p. 153-169.
- YOUNG, B.L.; WHITE, N.A.; DONALDSON, L.L. et al. Treatment of ischaemic jejunum with topical and intraluminal Carolina Rinse. *Equine Vet. J.*, v. 34, p. 469-474, 2002.

Anexo 1. Curvas de RT-PCR (reação de transcrição da polimerase reversa em cadeia em tempo real) para fator de necrose tumoral alfa (TNF- σ) indicando o número de ciclos (Ct – “cycle threshold”) de uma amostra individual (A) e de todas as amostras (B) de jejuno sob isquemia venosa completa dos equinos do grupo controle.



Anexo 2. Curvas de RT-PCR (reação de transcrição da polimerase reversa em cadeia em tempo real) para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) indicando a temperatura de fusão (T_m – “melting curve”) de uma amostra individual (A) e de todas as amostras (B) de jejuno sob isquemia venosa completa dos eqüinos do grupo controle.

