

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ALÓGENAS NA REPARAÇÃO DA LESÃO BRANDA DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA
ZELÂNDIA**

ALVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA

VILA VELHA-ES

AGOSTO / 2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ALÓGENAS NA REPARAÇÃO DA LESÃO BRANDA DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA
ZELÂNDIA**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ALVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA

VILA VELHA-ES

AGOSTO / 2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

O48i Oliveira, Alvaro de Paula Lage de.

Infusão intravenosa de células tronco mesenquimais alógenas na reparação da lesão branda de isquemia/reperfusão intestinal em coelhos Nova Zelândia / Alvaro de Paula Lage de Oliveira. – 2014.

80 f.: il.

Orientador: Betânia Souza Monteiro.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Coelho. 2. Isquemia. 3. Doenças inflamatórias intestinais. I. Monteiro, Betânia Souza. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 616.340149

ALVARO DE PAULA LAGE DE OLIVEIRA

**INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ALÓGENAS NA REPARAÇÃO DA LESÃO BRANDA DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA
ZELÂNDIA**

Dissertação apresentada a Universidade
Vila Velha, com pré-requisito do Programa
de Mestrado em Ciência Animal, para
obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal.

Aprovada em 13 de Agosto de 2014,

Banca Examinadora:



Rafael Resende Faleiros (UFMG)



Clarisse Simões Coelho (UVV)



Betânia Souza Monteiro (UVV - Orientadora)

DEDICATÓRIA:

Primeiramente a Deus, aos meus pais, responsáveis por todo apoio, carinho e amor fundamentais a este caminho percorrido até aqui. Vocês são os meus verdadeiros exemplo de vida!

Aos meus irmãos que mesmo na distância, física ou não, sempre me deram carinho e estiveram presentes, tornando os obstáculos da vida menos dolorosos.

À minha vó, uma pessoa que amo muito, responsável por minha educação, a base de tudo!

À Tia Katia (in memorian), sempre com uma palavra de sabedoria, minha principal estimuladora e responsável por eu chegar até aqui. Eterna saudade!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora **Betânia Souza Monteiro**, uma pessoa de grande sabedoria, diretriz do meu aprendizado humano e profissional, obrigado pelos anos de convivência, pelas conversas sempre proveitosas, por me ensinar o verdadeiro significado de ser pesquisador. Nunca poderei agradecer tudo o que fez por mim.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)** pela concessão da bolsa que viabilizou meus estudos, dedicação e ao apoio financeiro ao projeto.

À **coordenação do Hospital Veterinário “ Prof. Ricardo Alexandre Rippler”** pela autorização para utilização das instalações.

À **Julia**, companheira de todos os dias, que soube suportar o nervosismo dos dias decisivos, e ao mesmo tempo retribuir com amor e carinho. Pessoa que amarei sempre.

Aos meus **tios, tias, primos e primas**, que mais uma vez me apoiaram, foram pacientes e compreenderam a minha ausência no dia a dia e em diversas datas importantes.

Aos colegas que auxiliaram na condução do projeto **Chiquinho, Noely, Bruna, Manu, Flávia, Thiago, Laura, Carlos, Vivi**. Vocês foram excepcionais em todos os dias de experimento cuidando dos animais e sabendo-os respeitar.

Ao meu amigo **Wagner Fiorio** que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho, me enriquecendo profissionalmente e pessoalmente também.

Ao meu amigo **Odael**, um excelente profissional que está sempre por perto, disposto a oferecer uma palavra amiga, o meu agradecimento por todo o seu apoio oferecido.
Um grande amigo.

À minha segunda família **Piccoli**, vó **Iza** e todos integrantes pelo apoio, carinho e almoços que tornaram dias difíceis mais prazerosos.

À **Gabriela**, mais que uma amiga, uma irmã.

Aos meus amigos que tanto me ajudaram me dando força nas horas difíceis dos estudos e da vida.

Aos funcionários **Juckleber, Terezinha e Lurdinha**, que tantas vezes ajudaram nos cuidados dos animais e preparativos para realização do estudo.

Ao professor **Juquinha** (UFV) pela disponibilização de animais para execução do projeto.

Aos professores, **Tatiana, Clarisse, Daniela, Kill, Douglas, Eduardo, Fábio, Flaviana, João e Vinicius**, que participaram efetivamente desses meus 2 anos de

mestrado, passando ensinamentos, conselhos e sugestões para meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de mestrado, **Stefano, Laura, Fernanda e Clarissa** (tops) que estiveram sempre presentes nos estudos em grupo, compartilhando informações úteis e outras, nem sempre tão úteis assim, mas que sempre alegravam nossos dias.

A todos os colaboradores da UVV que me apoiaram durante estes anos de estudos, e aqueles que não se encontram vinculados à instituição mais (**Giuliano, Gustavo, Belisário** *(in memorian)*),

Aos meus filhos peludos, **Mel, Brida, Pitty, Pucca, Hanna, Nara, Merlin, Guti e Zafira**, que me mostraram como sou apaixonada por animais, recebendo destes o carinho necessário para que todo este caminho fosse percorrido com ainda mais incentivo.

Também não poderia deixar de agradecer os **animais** que participaram de forma direta ou indireta deste projeto, e que Deus abençoe todas eles.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELA	IX
RESUMO GERAL	XIII
CAPÍTULO 1 - FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL	
Resumo	1
1 Introdução	2
2 Fisiopatogenia da lesão de isquemia	3
3 Fisiopatogenia da lesão de reperfusão	4
4 Considerações finais	7
5 Referências bibliográficas	8
CAPITULO 2 – ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA	
Resumo	11
1 Introdução	12
2 Material e Métodos	14
2.1 Animais de experimentação (<i>in vitro</i>)	14
2.2 Determinação do segmento vascular a ser clampeado	14
2.3 Procedimentos anestésicos	15
2.4 Procedimento cirúrgico	17
2.5 Grupos experimentais	17
2.6 Avaliação macroscópica transcirúrgica	19
2.7 Exame histopatológico	20
2.8 Análise estatística	22
3 Resultados	23
4 Discussão	32
5 Conclusão	35
6 Referências bibliográficas	36

**CAPITULO 3 – INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
COMO TERAPIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS
NOVA ZELÂNDIA**

Resumo	38
1 Introdução	39
2 Material e Métodos	41
2.1 Animais de experimentação	41
2.2 Cultura celular	41
2.2.1 Caracterização celular	42
2.2.2 Diferenciação osteogênica	42
2.2.3 Preparo das células para infusão	43
2.3 Procedimentos anestésicos	43
2.4 Procedimento cirúrgico	44
2.5 Grupos experimentais e tratamentos	44
2.6 Avaliação macroscópica transcirúrgica	45
2.7 Avaliação de translocação bacteriana (TB)	46
2.8 Exame histopatológico	46
2.9 Análise estatística	47
3 Resultados	49
4 Discussão	59
5 Conclusão	61
6 Referências bibliográficas	62

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 1 - FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL

Figura 1 – Esquema representando eventos fisiopatológicos da lesão de isquemia e reperfusão intestinal. 6

Capítulo 2 - ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Figura 1 – Avaliação da irrigação mesentérica do jejuno de coelho após a realização da técnica de injeção de látex natural branco 16

Figura 2 – Clipes vasculares utilizados durante a celiotomia mediana pré-retroumbilical de coelhos Nova Zelândia 17

Figura 3 – Segmento intestinal de jejuno submetido a oclusão da artéria/veia margina peri-intestinal extramural de animal alocado no grupo submetido à I2H. 23

Figura 4 – Segmento intestinal de jejuno de animal alocado no grupo submetido à I2H/R5H. 24

Figura 5 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo Sham exibindo aspectos histopatológicos normais nas camadas mucosa, submucosa e muscular de segmento intestinal. 25

Figura 6 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H exibindo formação de espaço subepitelial em região apical de mucosa no segmento intestinal 26

Figura 7 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R1H exibindo dilatação linfática em mucosa intestinal leve/moderada classificada como escore 2. 28

Figura 8 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I1H/R2H exibindo edema de submucosa intestinal moderado, classificado como 30

escore 3.

Figura 9 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H exibindo dilatação intensa de vasos linfáticos em submucosa intestinal, classificada como escore 2. **31**

Capítulo 3 - INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TERAPIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Figura 1 – Imagem de microscopia óptica exibindo cultura de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelho. **50**

Figura 2 – Segmento intestinal de jejuno de animais alocados, submetidos à duas horas de isquemia e cinco horas de reperfusão. **52**

Figura 3 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H PBS 7D exibindo espaço subepitelial em região de mucosa, classificado com escore 2 e hemorragia incipiente (escore 1). **53**

Figura 4 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H PBS 3D exibindo edema de mucosa. **53**

Figura 5 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H CTM 7D exibindo mucosa e submucosa com aspectos histopatológicos normais **56**

Figura 6 – Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H CTM 7D exibindo mitose de células em região de criptas e interstício em mucosa intestinal. **58**

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 2 - ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Tabela 1 – Resumo/delineamento proposto para a confecção dos grupos experimentais	20
Tabela 2 – Escore para lesão em mucosa de jejuno de coelho Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural	21
Tabela 3 – Escore para edema, hemorragia e presença de polimorfonucleares nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelho Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural	21
Tabela 4 – Escore para dilatação de vasos linfáticos nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelho Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural	21
Tabela 5 – Escore para processo inflamatório mononuclear nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelho Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural	22
Tabela 6 – Resultados, em escore, das análises histológicas de lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural segundo Chiu et al. (1970).	25
Tabela 7 – Resultados, em escore, das análises histológicas de edema em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	26

Tabela 8 – Resultados, em escore, das análises histológicas de hemorragia em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	27
Tabela 9 – Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PMN em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	27
Tabela 10 – Resultados, em escore, das análises histológicas de dilatação de linfático em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	28
Tabela 11 – Resultados, em escore, das análises histológicas de edema em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	29
Tabela 12 – Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PMN em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	30
Tabela 13 – Resultados, em escore, das análises histológicas de dilatação de linfático em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.	31
Capítulo 3 - INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TERAPIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA	
Tabela 1 – Resumo/delineamento proposto para confecção dos grupos experimentais.	45
Tabela 2 – Escore para lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da	47

artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

Tabela 3 – Escore para edema, hemorragia e presença de polimorfonuclear nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 47

Tabela 4 – Escore para dilatação de vasos linfáticos nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 47

Tabela 5 – Escore para processo inflamatório mononuclear nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 47

Tabela 6 – Resultados, em escore, das análises histológicas de lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural, segundo Chiu et al. (1970). 52

Tabela 7 – Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PMN em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 54

Tabela 8 – Resultados, em escore, das análises histológicas de PIM em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 54

Tabela 9 – Resultados, em escore, das análises histológicas de dilatação de linfático em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 55

Tabela 10 – Resultados, em escore, das análises histológicas de edema em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à 56

isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

Tabela 11 – Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PMN em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 57

Tabela 12 – Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PIM em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural 57

Tabela 13 – Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de dilatação linfática em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. 58

RESUMO

OLIVEIRA, Alvaro de Paula Lage de, MSc., Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2014. **Infusão intravenosa de células tronco mesenquimais alógenas na reparação da lesão branda de isquemia/reperfusão intestinal em coelhos Nova Zelândia.** Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

A lesão de isquemia e reperfusão (I/R) intestinal é um fenômeno complexo que pode causar dano tecidual local e remoto, levando à insuficiência múltipla dos órgãos, sendo responsável por elevada taxa de mortalidade. Vários são os experimentos realizados em modelos animais buscando tratamentos eficientes para amenizar os efeitos lesionais dos radicais livres. Acredita-se que os efeitos deletérios causados pelo processo de reperfusão são maiores quando comparados à isquemia, devido à circulação de toxinas liberadas secundárias a hipóxia, perda da integridade de membrana celular, liberação de radicais livres e lesões endoteliais durante a reperfusão. O presente estudo objetivou a realização de duas etapas experimentais em coelhos Nova Zelândia, induzindo lesões de isquemia e reperfusão (I/R) intestinal através do clampeamento da artéria marginal peri-intestinal extramural para posteriormente serem tratados com células tronco mesenquimais (CTM). A primeira etapa foi destinada a estabelecer uma metodologia capaz de causar lesões de I/R intestinais compatível à vida, mas passíveis a tratamento. Foram utilizados 36 animais da raça Nova Zelândia, machos, com peso médio 3,5 kg, de 10 semanas de idade, distribuídos em seis grupos experimentais: grupo Sham (controle negativo); grupo I1H (uma hora de isquemia); grupo I2H (duas horas de isquemia); grupo I1H/R2H (uma hora de isquemia/duas horas de reperfusão), grupo I2H/R1H (duas horas de isquemia/uma hora de reperfusão); grupo I2H/R5H (duas horas de isquemia/cinco horas de reperfusão). A partir de avaliações macroscópicas e histológicas realizadas por um avaliador cego ao estudo em relação aos grupos experimentais, conclui-se que as lesões se demonstraram mais intensa nos maiores tempos de isquemia e reperfusão. Também os animais do grupo I2H/R5H compuseram um grupo experimental de fácil reprodução e obtiveram em geral lesões moderadas, diferentes do encontrado nos demais grupos, sendo dessa forma o grupo escolhido para realizar a segunda etapa do estudo. A segunda etapa do estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia da infusão CTM derivada de tecido adiposo sobre diminuição das lesões teciduais locais e remotas, causadas pelo evento de I/R intestinal experimental. Para esta etapa foram

utilizados 3 animais para obtenção, cultivo e caracterização das CTM provenientes de tecido adiposo (ADCTM). Ao obter células de quarta passagem consideradas viáveis para tratamento, foram utilizados para estudo *in vivo* 24 animais, adulto-jovens, pesando aproximadamente 3,5kg, divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, denominados IR Tratado com CTM (I2H/R5H CTM 3D; I2H/R5H CTM 7D); IR Tratado PBS (I2H/R5H PBS 3D; I2H/R5H PBS 7D). Os animais foram anestesiados e submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical. Todos os animais foram isquemiados com auxílio de clipe vascular em artéria marginal peri-intestinal extramural por 2 horas. Após esse período, o fluxo sanguíneo foi restabelecido, a anestesia inalatória suspendida e os animais despertados. Após 5 horas de reperfusão realizou os tratamentos, por infusão endovenosa, conforme grupos experimentais. Os animais foram avaliados 72 horas e sete dias após o tratamento quanto ao aspecto macroscópico (coloração e peristaltismo) do segmento jejunal e por meio de avaliação histológica do segmento isquemiado quanto à presença ou ausência de destruição de mucosa intestinal, edema, hemorragia, dilatação de vasos linfáticos e presença de células inflamatórias polimorfonucleares tanto em mucosa quanto submucosa. Os resultados observados revelaram que os grupos tratados com ADCTM obtiveram menores lesões em mucosa e submucosa quando comparados aos grupos tratados com PBS. Ainda os grupos tratados com ADCTM obtiveram resposta inflamatória controlada e maior taxa mitótica, resultados relacionados ao potencial terapêutico das CTM.

Palavras-chave: células tronco derivadas de adipócitos, lesão intestinal, artéria/veia marginal peri-intestinal extramural, clampeamento.

CAPÍTULO 1 - FISIOPATOLOGIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL

Oliveira, A.P.L.; Rangel, J. P. P.; Monteiro, B.S.

RESUMO

O objetivo desta revisão é abordar informações atuais sobre a lesão de isquemia e reperfusão que acomete o sistema gastrointestinal em animais, por ser um tipo de injúria classificada como um fenômeno complexo que pode causar dano tecidual local e remoto, levando à insuficiência múltipla dos órgãos. Acredita-se que os efeitos deletérios causados pelo processo de reperfusão são maiores quando comparados à isquemia, devido à circulação de toxinas liberadas secundárias a hipóxia, perda da integridade de membrana celular, liberação de radicais livres e lesões endoteliais durante a reperfusão. Sabe-se que, na Medicina Veterinária, a maioria das emergências abdominais (abdome agudo) proporciona disfunções microcirculatórias gastrointestinais e seu diagnóstico ainda é um desafio, pois os sinais clínicos se assemelham a outras doenças. A lesão de reperfusão é uma das causas responsáveis pela morbidade e mortalidade associada à isquemia intestinal, afecção comum, principalmente na espécie equina. As lesões de Isquemia/Reperfusão (I/R) intestinais são consideradas de extrema importância devido à sua gravidade e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos destas lesões faz-se necessária para que se determinem estratégias terapêuticas para as principais espécies domésticas.

Palavras-chave: Hipóxia, apoptose celular, radicais livres, abdome agudo, disfunções microcirculatórias.

1- INTRODUÇÃO

A lesão de isquemia e reperfusão (I/R) é caracterizada pela redução ou interrupção do fluxo sanguíneo seguido por uma sequência de alterações vasculares que acarretam na produção de radicais livres durante o restabelecimento do fluxo sanguíneo a um tecido isquêmico (MATOS et al., 2000). A reintrodução repentina de oxigênio, também chamada de reperfusão, aumenta a lesão tecidual e vascular, acelerando o processo de necrose celular (TONG et al., 2012). Apesar de existir diversos estudos sobre as lesões de isquemia e reperfusão, apenas a partir de 1986 é que se demonstrou que a lesão de reperfusão causaria maior dano tecidual e sistêmico do que a lesão isquêmica em si (PARKS & GRANGER, 1986; SANTOS et al., 2008).

O intestino é irrigado pela circulação mesentérica, recebendo cerca de 20 a 25% do volume sanguíneo total do organismo (VOLLMAR & MENDER, 2011). Deste volume, aproximadamente 70% direciona-se para a mucosa e submucosa mantendo a homeostase e a funcionalidade das criptas e vilosidades intestinais. Este órgão é muito sensível a qualquer tipo de diminuição do fluxo sanguíneo, sobretudo a porção delgada (YASUHARA, 2005). Por esse motivo, mecanismos de autorregulação visando à manutenção do fluxo constante são deflagrados em situações nas quais ocorre a queda de pressão arterial sistêmica ou estímulo de tônus simpático (VOLLMAR & MENDER, 2011).

Qualquer injúria capaz de proporcionar isquemia intestinal tem alto potencial de progressão, causando danos teciduais (YASUHARA, 2005), como por exemplo, edema em submucosa seguido de afrouxamento do epitélio da mucosa superficial e a ocorrência de úlceras e/ou sangramentos das vilosidades intestinais (BRASILEIRO et al., 2013). Consequente ao insulto isquêmico, a etapa de reperfusão leva a alteração da permeabilidade vascular e perda da integridade da barreira intestinal provocadas pelas espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios causando danos como hemorragias e translocação bacteriana (YASUHARA, 2005; KOSTOPANAGIOTOU et al., 2007; VOLLMAR & MENDER, 2011; BRASILEIRO et al., 2013).

As afecções intestinais que acarretam a síndrome de abdome agudo em pacientes veterinários, como por exemplo, as obstruções estrangulatórias (torções, vólvulos, intussuscepções e hérnias estranguladas) e não estrangulatórias (ROWE &

WHITE, 2002), têm o potencial de desenvolver as lesões de isquemia e reperfusão e cursam com altas taxas de mortalidades, entre 60 a 80% dos casos (RITZ et al., 2005; BOYBEYI et al., 2014). Clinicamente, observa-se a presença de diarreia, vômito e/ou dor abdominal intensa, sinais que podem estar associados à ocorrência de isquemia intestinal aguda (RAVIPATI et al., 2011).

As lesões de Isquemia/Reperfusão (I/R) intestinais são consideradas de extrema importância devido à sua gravidade (GAO et al., 2006; JIANG et al., 2011; VOLLMAR & MENDER, 2011) e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos destas lesões faz-se necessária para que se determine estratégias terapêuticas para as principais espécies domésticas.

2-FISIOPATOGENIA DA LESÃO DE ISQUEMIA

No momento em que o fluxo sanguíneo tissular é interrompido, uma série de eventos metabólicos e enzimáticos compensatórios é desencadeada (EVORA et al., 1996). A baixa oferta de oxigênio celular acarretará na diminuição da produção de trifosfato de adenosina (ATP) pelas mitocôndrias, diminuindo a concentração intracelular desta molécula em contrapartida ao aumento de monofosfato de adenosina (AMP).

Na tentativa de manter a função tecidual e em resposta ao aumento de AMP, as células iniciarão a produção de energia por metabolismo anaeróbio (glicólise), gerando ácido láctico e íons H^+ (MOORE et al., 1995). O ácido láctico acumulado diminui o pH intracelular o que dificulta ainda mais a manutenção da função celular, devido ao esgotamento das fontes de energias celulares. Sem energia, as bombas de membrana responsáveis pelo fluxo de íons das células cessam suas funções, ocasionando o influxo de fluido e íons de cálcio para o espaço intracelular (“paradoxo do cálcio”), iniciando a lesão em mitocôndria e sarcolema e acarretando edemas (FARBER et al., 1981; EVORA et al., 1996; SILVA JR et al., 2002; SLONE & FLEMING, 2014).

A lesão mitocondrial irá contribuir com a diminuição da atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada ao hidrogênio (NADH) desidrogenase, do carreador de adenosina difosfato / adenosina trifosfato (ADP/ATP) e da ATP sintetase, e com o aumento da atividade da fosfolipase A2, criando um gradiente

iônico sobre a membrana celular, alterando o remanejamento de cálcio no citosol (KONO et al., 1982; SILVA JR et al., 2002).

Este processo irá potencializar o aumento de cálcio citoplasmático, ativando uma protease que poderá converter a xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO) (McCORD, 1985; NILSSON et al., 1994; GRECA et al., 2008). Ao mesmo tempo haverá uma depleção do ATP, acumulando AMP que será catabolizado em adenosina e inosina, por fim em hipoxantina (GRECA et al., 2008).

Dentre as causas mais comuns de isquemia intestinal estão a obstrução mesentérica aguda e colite isquêmica, que irão culminar em diminuição do aporte sanguíneo tecidual e redução de oxigênio intestinal (YASUHARA, 2005; ROWE & WHITE, 2002). A isquemia intestinal progride rapidamente causando danos teciduais, principalmente a necrose das células teciduais, produção de toxinas, perda de integridade de membrana e translocação bacteriana (YASUHARA, 2005; VOLLMAR e MENDER, 2011; BRASILEIRO et al., 2013), podendo causar sequelas em pulmão e ocasionar a falência múltipla dos órgãos (SLONE & FLEMING, 2014).

3-FISIOPATOGENIA DA LESÃO DE REPERFUSÃO

As conseqüências da isquemia nos diferentes tecidos e órgão são dependentes do tempo duração do evento e muitas das lesões serão desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual (SILVA JR. et al., 2002). O mecanismo de reperfusão tornou-se um assunto muito discutido por causar lesões locais e sistêmicas, predispondo à formação moléculas de oxigênio reativas que irão causar lesão por todo organismo (PARKS & GRANGER, 1986; GRECA et al., 2001; LOCK, 2002; EDWARD et al., 2003; GRECA et al., 2008; SANTOS et al., 2010; SLONE & FLEMING, 2014). Os efeitos deletérios causados pelo processo de reperfusão serão maiores quando comparados à isquemia, devido ao acúmulo de toxinas durante este evento, e sua posterior distribuição por todo organismo durante a reperfusão (GRECA et al., 2008).

A etapa de reperfusão é caracterizada pelo retorno do fluxo sanguíneo para o local de isquemia. Consequentemente, os metabólitos oriundos do metabolismo anaeróbico do tecido lesado ganham a corrente sanguínea, causando maiores danos teciduais locais e sistêmicos se comparado a danos somente causados pela

isquemia (GRANGER & KORTHUIS, 1995; GRECA et al., 2001; LOCK, 2002; EDWARD et al., 2003; CHEN et al., 2003; GRECA et al., 2008; KÖHLER et al., 2011; BEN et al., 2012; BRASILEIRO et al., 2013).

Todo processo de I/R irá causar uma série de lesões (Figura 1), mediadas através de radicais livres de oxigênio produzidos por células parenquimatosas e/ou por células inflamatórias. Estes radicais irão migrar para os tecidos locais e distantes causando lesão (FERRO et al., 2010; ROCHA et al., 2012).

A hipoxantina, produzida em consequência à hipóxia e acumulada durante a reperfusão, sofrerá ação pela xantina oxidase (XO), juntamente com a presença de oxigênio molecular (reoxigenação tecidual), tornando-se radicais livres de oxigênio, também chamados de superóxidos ou espécies reativas de oxigênio (ROS), como por exemplo, os ânions superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes ainda poderão sofrer redução e transformam-se em hidroxilas reativas que iniciaram a peroxidação lipídica (McCORD, 1985; PITT et al., 1991; MOORE et al., 1995; HIRATA et al., 1996; GRECA et al., 2008; BATTELLI et al., 2014).

O evento reperfusão associado ao influxo de cálcio para o meio intracelular (EVORA et al., 1996) aumentará a ativação das enzimas como a fosfolipase, que agem degradando a membrana plasmática e alterando a função estrutural das células. As proteases e lipases também são ativadas e agem degradando as organelas (MOORE et al., 1995). Este evento irá alterar de forma estrutural e funcional os lipídeos presentes na membrana celular, originando uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) exacerbada, aumento da permeabilidade endotelial para fluidos, macromoléculas e células inflamatórias, além de agravar a lesão causada pela isquemia (McCORD, 1985; MOORE et al., 1995; McQUAID & KEENAN, 1997; COHEN et al., 1997; GRECA et al., 2008; BELKNAP et al., 2009; LASKOSKI et al., 2012).

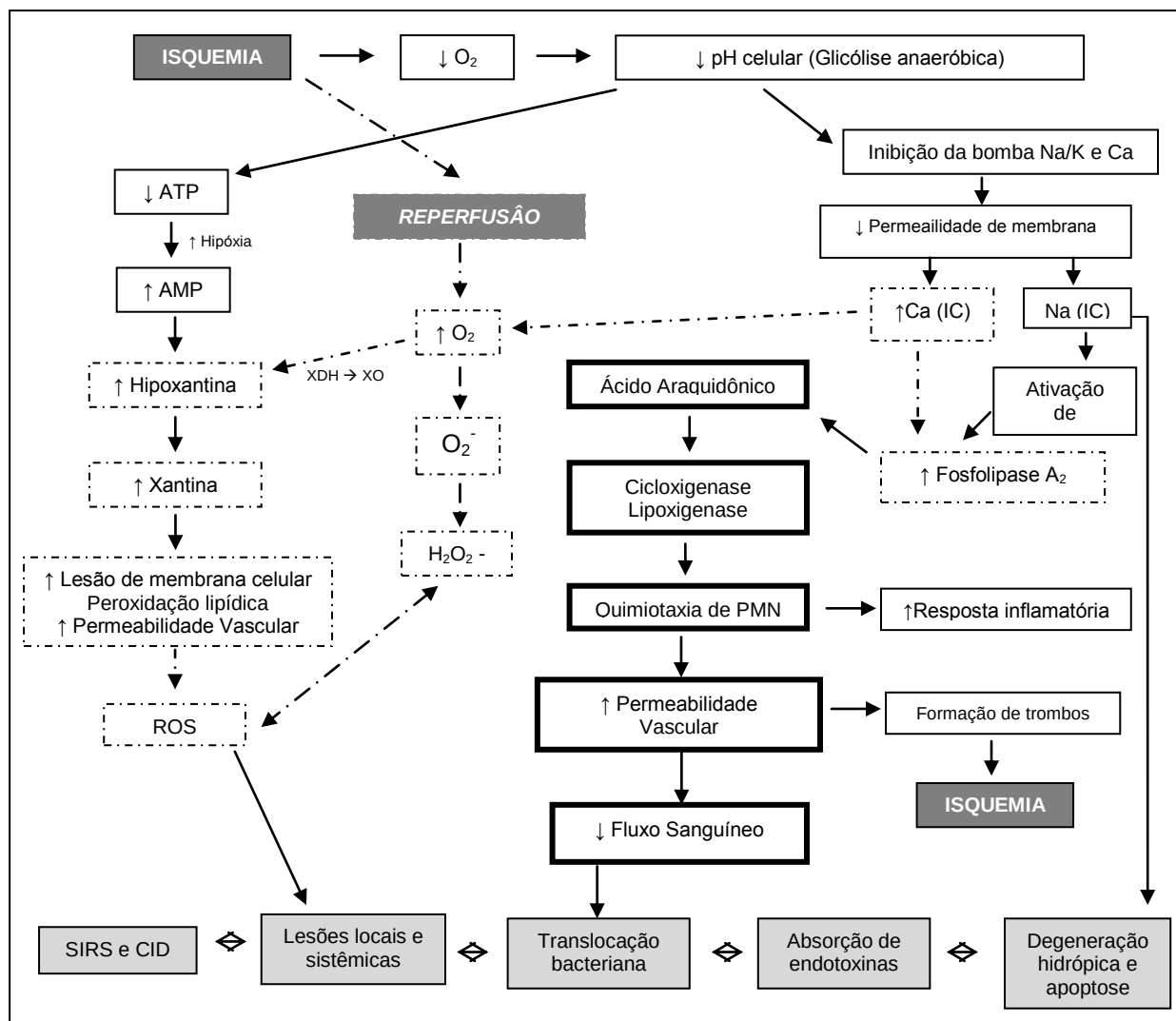


Figura 1. Esquema representando eventos fisiopatológicos da lesão de isquemia e reperfusão intestinal. Após um evento isquêmico ocorrerá diminuição da oferta de oxigênio (O_2), diminuição da produção de trifosfato de adenosina (ATP), desequilíbrio hidroeletrólítico através da alteração de permeabilidade de membrana, promovendo influxo de cálcio para o meio intracelular ($Ca - IC$), ativação das proteases e lipases, principalmente a fosfolipase A2. Essa enzima irá promover lesão em fosfolípídeos de membrana; liberação de $\acute{a}c.$ Araquidônico, fator de agregação plaquetária (FAP) e lisofosfatidilcolina. O $\acute{a}c.$ Araquidônico irá promover a síntese de eucosanóides, causando efeitos vasoativos (vasodilatação; aumento da permeabilidade vascular; agregação plaquetária e quimiotaxia de PMN). Juntamente os FAP e a lisofosfatidilcolina irão promover intensificação dos processos instaurados. Ainda durante a isquemia haverá acúmulo de hipoxantina. Com a reintrodução de oxigênio no tecido (reperfusão), ocorrerá a conversão da xantina desidrogenase (XDH) em xantina oxidase (XO), que atuará sobre a hipoxantina acumulada, convertendo em xantina e $\acute{a}c.$ Úrico, e produzindo grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), como por exemplo, os ânions superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Também durante este evento haverá aumento $Ca - IC$, exacerbando as atividades enzimáticas, e agravando a lesões já existentes. A soma dos eventos e dos produtos secundários a I/R poderá causar e/ou potencializar a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), coagulação intravascular disseminada (CID), translocação bacteriana, absorção de endotoxinas, apoptose celular e demais lesões locais e sistêmicas no organismo.

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fisiopatologia da I/R intestinal ocorre de forma gradativa e momentânea, tornando-se um evento altamente complexo devido a sua proporção sistêmica. Se tratando de um órgão altamente dependente de função vascular sadia, nas situações que culminem no surgimento das lesões de I/R, ocorrerá falha na nutrição celular, liberação da cascata de mediadores inflamatórios, resposta ao processo inflamatório, perda da função da barreira epitelial intestinal. Somado ao fato de que irão ocorrer lesões no endotélio vascular intestinal, a flora bacteriana residente no intestino, poderá alcançar caráter sistêmico levando a translocação bacteriana sistêmica. A presença de bactéria na circulação, bem como a resposta inflamatória sistêmica mediante aos quadros de endotoxemia interferem de forma direta no prognóstico das afecções que cursam com quadro de I/R aguda, sendo considerado ruim.

Os eventos são considerados multifatoriais e interdependentes. Portanto a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos é considerada de grande importância para que possamos melhorar o prognóstico de pacientes acometidos por esta lesão.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATTELLI, M. G.; BOLOGNESI, A.; POLITO, L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1842, p. 1502-1517, 2014.
- BELKNAP, J.; MOORE, J. N.; CROUSER, E. C. Sepsis: From human organ failure to laminar failure. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 155-157, 2009.
- BEN, D. F.; YU, X. Y.; JI, G. Y.; ZHENG, D. Y.; LV, K. Y.; MA, B.; XIA, Z. F. TLR4 mediates lung injury and inflammation in intestinal ischemia-reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 174, p. 326-333, 2012.
- BOYBEYI, O.; GUNAL, Y. D.; ATASOY, P.; KISA, U.; ASLAN, M. K. The effect of colchicine and low-dose methotrexate on intestinal ischemia/ reperfusion injury in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, 2014. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.01.057.
- BRASILEIRO, J. L.; INOYE, C. M.; AYDOS, R. D.; SILVA, I. S.; FALCÃO, G. R.; MARKS, G.; PEREIRA, D. M. Ischemia and reperfusion of rat small intestine using pentoxifylline and prostaglandin E1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, p. 767-773, 2013.
- CHEN, L. W.; EGAN, L.; LI, Z. W. The two faces of IKK and NF- κ B inhibition: Prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. **Natural Medicene**, v. 9, p. 575 - 581, 2003.
- COHEN, S. M.; SIDDIGI, F. A.; DARAKCHIEV, B.; FANTINI, G. A.; HAIRI, R. J.; BARIE, P. S. Attenuation of acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion injury by butylactone anti-inflammatory agent FL 1003. **The Journal of Trauma**, v. 43, p. 247-252, 1997.
- EDWARD, M. S.; CHERR, G. S.; CRAVEN, T. E.; OLSEN, A. W.; PLONK, G. W.; GEARY, R. L.; LIGUSH, J. L.; HAMSEN, K. J. Acute occlusive mesenteric ischemia: surgical management and outcomes. **Annals of Vascular Surgery**, v. 17, p. 72-79, 2003.
- EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de isquemia reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.66, p. 239-245, 1996.
- FARBER, J. L.; CHIEN, K. R.; MITTNNACHT, S. JR. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. **The American Journal of Pathology**, v. 102, p. 271-281, 1981.
- FERRO, C. O.; CHAGAS, V. L. A.; OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L.; SCHANAIDER, A. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 37, p. 31-38, 2010.
- GAO, C. J.; CHAI, W.; XU, L.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; HAN, L.; SUN, X. Protective effects of hyperoxygenated solution preconditioning on intestinal ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Journal of Surgical Research**, v. 135, p. 268-274, 2006.
- GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 311-332, 1995.
- GRECA, F. H.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos da isquemia e reperfusão intestinal na cicatrização de anastomoses do intestino estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, p. 9-15, 2001.
- GRECA, F. H.; GONÇALVES, N. M. F. M.; SOUZA FILHO, Z. A.; NORONHA, L.; SILVA, R. F. K. C.; MICHEL, R. R. The protective effect of methylene blue in lungs, small bowel and kidney after intestinal ischemia and reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, p. 149 - 156, 2008.

- HIRATA, Y.; TAGUCHI, T.; NAKAO, M. The relationship between the adenine nucleotide metabolism and the conversion of the xanthine oxidase enzyme system in ischemia-reperfusion of the rat small intestine. **Journal Pediatric Surgery**, v. 31, p. 1199-1203, 1996.
- JIANG, H.; QU, L.; LI, Y.; GU, L.; SHI, Y.; ZHANG, J.; ZHU, W.; LI, J. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 168, p. 127-134, 2011.
- KÖHLER, H. F.; DELLUCA, I. M. S.; SBRAGIA NETO, L. Antioxidantes enterais em lesões de isquemia e reperfusão em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 38, p. 422-428, 2011.
- KONO, Y.; OZAWA, K.; TANAKA, J. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. **Transplantation**, v. 33, p. 150-155, 1982.
- KOSTOPANAGIOTOU, G.; AVGERINOS, E.; COSTOPANAIOTOU, C.; ARKADOPOULOS, N.; ANDREADOU, I.; DIAMANTOPOULOU, K.; LEKKA, M.; SMYRNIOTIS, V.; NAKOS, G. Acute lung injury in a rat model of intestinal Ischemia-Reperfusion: the potential time depended role of phospholipases A2. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 108-116, 2007.
- LASKOSKI, L. M.; VALADÃO, C. A. A.; VASCONCELOS, R. O.; FALEIROS, R. R.; MENDES, H. M. F.; FERRUCCI, D.; SILVA, J. A. F.; MACHADO, D. D. R. S. Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e calprotectina no tecido laminar de equinos após obstrução jejunal, tratados ou não com hidrocortisona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 817-823, 2012.
- LOCK, G. Acute mesenteric ischemia: classification, evaluation and therapy. **Acta Gastroenterology Belgica**, v. 65, p. 220-225, 2002.
- MATOS, J. J. R. T.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R.; JÚNIOR, A. D. P. M. Lesões de isquemia e reperfusão no intestino de eqüinos: fisiopatologia e terapêutica. **Ciência Rural**, v. 30, p. 1083-1093, 2000.
- MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 159-163, 1985.
- MCQUAID, K. E.; KEENAN, A. K. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: role for nitricoxide? **Experimental Physiology**, v. 82, p. 369-376, 1997.
- 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. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, p. 115-132, 1995.
- NILSSON, U. A.; SCHOENBERG, M. H.; ANEMAN, A. Free radicals and pathogenesis during ischemiaand reperfusion of the cat small intestine. **Gastroenterology**, v. 106, p. 629-636, 1994.
- PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **The Americam Journal of Physiology**, v. 250, p. 749-753, 1986.
- PITT, R. M.; MCKELVEY, G.; SAENGER, F. S. A tungsten-supplemented diet delivered by transplacental and breast-feeding routes lowers intestinal xanthineoxidase activity and affords cytoprotection in ischemia-reperfusion injury to the small intestine. **Journal Pediatric Surgery**, v. 26, p. 930-935, 1991.
- RAVIPATI, M.; KATRAGADDA, S.; GO, B.; ZARLING, E. J. Acute mesenteric ischemia: a diagnostic challenge in clinical practice. **Practical Gastroenterology**, v.38, p.35-38, 2011.
- RITZ, J. P.; GERMER, C. T.; BUHR, H. J. Prognostic factors for mesenteric infarction: multivariate analysis of 187 patients with regard to patient age. **Annals of Vascular Surgery**, v.19, p.328-34, 2005.
- ROCHA, B. C.; MENDES, R. R. S.; LIMA, G. V.; ALBUQUERQUE, G. Z.; ARAÚJO, L. L.; JESUS, M. N. S.; SANTOS, W. L. C.; CARREIRO, M. C. Modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal

porclameamento de aorta abdominal em ratos Wistar. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, p. 207-210, 2012.

ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clinical techniques in equine practice**, v. 1, p.148-162, 2002.

SANTOS, C. H.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C.; MIJI, L. N.; BISPO, M. A. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, p. 22–28, 2008.

SANTOS, C. H.; PONTES, J. C.; MIJI, L. N.; NAKAMURA, D. I.; GALHARDO, C. A.; AGUENA, S. M. Postconditioning effect in the hepatic ischemia and reperfusion in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, p. 163-168, 2010.

SILVA-JUNIOR, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, p. 96-100, 2002.

SLONE, E. A.; FLEMING, S. D. Membrane lipid interactions in intestinal ischemia/reperfusion-induced Injury. **Clinical Immunology**, v.153, p. 228-240, 2014.

TONG, Z.; FANG, Y.; ZHONGHUA, L.; HAIDONG, L. Influence of ShuJinHuoXue tablets on ischemia reperfusion injury of animals' skeletal muscle. **Molecules**, v. 17, p. 8494-8505, 2012.

VOLLMAR, B.; MENDER, M.D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, p. 13-29, 2011

YASUHARA, H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. **Surgery Today**, v.35, p. 185-195, 2005.

ZHANG, F.; TONG, L.; QIAO, H.; DONG, X.; JIANG, H.; SUN, X. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. **Journal of Surgical Research**, v.149, p. 101-109, 2008.

CAPÍTULO 2 - ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Oliveira, A.P.L.; Rangel, J.P.P.; Bitti, F.B; Riodades, L.F.S.; Almeida, B.L.; Mathias, C.H.T.; Conti, L.M.C.; Fiorio, W.A.B.; Monteiro, B.S.

RESUMO

O presente estudo objetivou estabelecer uma metodologia capaz de causar lesões de isquemia e reperfusão intestinal, realizando clipagem de um ramo de artéria marginal peri-intestinal extramural em segmento jejunal. Para tal foram utilizados 37 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, de 10 semanas de idade, alocados em seis grupos experimentais: grupo Sham, controle negativo, submetido apenas a celiotomia mediana; grupo I1H submetido à oclusão vascular por uma hora; grupo I2H submetido a oclusão vascular por duas horas; grupo I1H/R2H submetido a oclusão vascular por uma hora, seguida de reperfusão por duas horas; grupo I2H/R1H submetido a oclusão vascular por duas horas, seguida de reperfusão por uma hora e grupo I2H/R5H submetido a oclusão vascular por duas horas seguida de reperfusão por cinco horas. Os animais foram avaliados quanto o aspecto macroscópico (coloração e peristaltismo) do segmento jejunal e quanto ao aspecto histopatológico, verificando presença ou ausência de destruição de mucosa, edema, hemorragia, dilatação de vasos linfáticos e presença de polimorfonucleares. Observou-se que as lesões macroscópicas e histopatológicas se acentuaram nos maiores tempos de isquemia e reperfusão empregados. Os animais submetidos à isquemia durante duas horas, seguida de reperfusão por cinco horas (I2H/R5H) compuseram o grupo experimental de fácil reprodução e foram os que apresentaram uma lesão intestinal moderada, diferentes dos demais grupos.

Palavras-chave: artéria marginal peri-intestinal extramural, clipe vascular, lesão em mucosa intestinal, lesão em submucosa intestinal, heterófilo, jejuno.

1- INTRODUÇÃO

A isquemia intestinal ocorre devido à diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo arterial e/ou venoso intestinal (hipóxia), provocando danos à mucosa. Este evento pode ocorrer devido à obstrução aguda ou crônica das artérias e/ou veias tais como o tronco celíaco, artéria mesentérica superior (AMS), artéria mesentérica inferior e/ou veia correspondentes, responsáveis por sua irrigação (CARDEN & GRANGER, 2000; RIBEIRO & YOSHIDA, 2005).

Geralmente, após a remoção do insulto isquêmico, ocorrerá um processo fisiológico de reperfusão intestinal, marcada por uma série de fatores que irão potencializar as lesões isquêmicas, aumentando a resposta inflamatória inicial, podendo ainda ocasionar uma reação sistêmica e falência múltipla dos órgãos (CARDEN & GRANGER, 2000; GAO et al., 2006).

Devido à alta taxa de mortalidade (60-80%) causada pelas lesões de isquemia e reperfusão (I/R) (RITZ et al., 2005; BOYBEYI et al., 2014), diversos estudos experimentais são realizados com o objetivo de esclarecer a fisiopatologia relacionada e propor terapias para as injúrias correlacionadas, sobretudo à reperfusão. Estima-se que entre 1980 e 2004 tenham sido produzidos mais de 800 trabalhos experimentais referentes às lesões I/R (RIBEIRO & YOSHIDA, 2005).

Dentre os modelos experimentais descritos, existem estudos desenvolvidos com ratos, coelhos, cães, gatos, suínos e equinos (KOSTOPANAGIOTOU et al., 2007; AVGERINOS et al., 2010; YURDAKAN et al., 2012). De acordo Ribeiro e Yoshida (2005), as cobaias mais utilizadas experimentalmente são os roedores (ratos e coelhos), representado por cerca de 73% dos estudos realizados, principalmente pela sua facilidade de trabalho, adequabilidade aos protocolos, disponibilidade e baixo custo, além de sua anatomia semelhante à humana. Ainda se destacam como principais espécies utilizadas o suíno (9%), caninos (8%), felinos (6%). Além da espécie animal, outras variabilidades dos modelos propostos são o tempo de isquemia, tempo de reperfusão, segmento intestinal submetido à lesão, parâmetros utilizados para avaliação e tratamentos idealizados (ZHAO et al., 2003; RIBEIRO & YOSHIDA, 2005).

Os estudos experimentais de lesões de I/R podem ser definidos por duas fases dessemelhantes: a fase isquêmica, na qual ocorre oclusão de um vaso, ou oclusão dos vasos nutridores, ou diminuição do fluxo sanguíneo circulante como, por exemplo, em choque hipovolêmico controlado; e a fase chamada de reperfusão, caracterizada pela desobstrução do vaso previamente ocluído ou correção do choque, de forma que a perfusão tecidual se torne adequada novamente (CARDEN & GRANGER, 2000; RIBEIRO & YOSHIDA, 2005).

Dentre os métodos de indução isquêmica existentes podemos destacar como os mais utilizados a obstrução arterial por meio de pinçamento vascular seguido de estenose ou compressão vascular extrínseca; fitas cirúrgicas de liberação controlada de fluxo sanguíneo e indução de choque hipovolêmico e hipotermia. Essa obstrução envolve a oclusão da artéria mesentérica cranial (AMC) (RITZ et al., 2005; GAO et al., 2006; SANTOS et al., 2008; JIANG et al., 2011; BEN et al., 2012; BOYBEYI et al., 2014) ou da AMC e veia mesentérica cranial (GUIMARÃES et al., 2002) ou da artéria marginal peri-intestinal extramural (PIMA) (GUAN et al., 2009). Alguns autores relatam que o pinçamento vascular representa o melhor método de aplicabilidade isquêmica por promover uma situação oclusiva igual em todos os animais e devido à semelhança nas situações clínicas (RIBEIRO & YOSHIDA, 2005).

O objetivo deste estudo foi estabelecer uma metodologia capaz de causar lesões de isquemia e reperfusão intestinal, realizando clipagem de um ramo de artéria marginal peri-intestinal extramural e comparar, por meio de avaliações macroscópicas e histopatológicas, as alterações estruturais encontradas nos diferentes tempos de isquemia e/ou reperfusão em segmentos intestinais, visando estabelecer o modelo experimental de fácil reprodução e que permita inferir um tempo de isquemia e reperfusão que acarrete uma lesão branda, contudo compatível com a vida do paciente e ainda com potencial para reparação, para testar futuros protocolos terapêuticos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Vila Velha, como número de protocolo de ética: 294/2014 CEUA/UVV

2.1 - Animais de experimentação

Para estudo foram utilizados 37 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, de aproximadamente 10 semanas, com peso médio de 3,0 kg, alocados em um container modificado, de 12 metros de comprimento, revestido com PVC e isolamento térmico, ar condicionado e exaustor para controle de temperatura e temporizador elétrico mantendo fotoperíodo de 12/12 horas luz e escuro.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, distribuídos de forma aleatória, recebendo água *ad libitum* e 100 gramas/dia de ração comercial para roedores (Ração do Sítio Coelho® - Guabi Nutrição Animal, Anápolis - GO).

2.2 – Determinação do segmento vascular a ser clampeado

Para realização dessa etapa, utilizou-se um animal, que foi submetido medicação pré-anestésica com xilazina (2,5 mg/kg) associado com cetamina (25,0 mg/kg), pela via intramuscular.

Após a sedação, a veia auricular lateral foi cateterizada, permitindo a administração da indução anestésica e eutanásia, utilizando sobredosagem anestésica de Tiopental Sódico (50 mg/kg/IV). Em seguida, a veia jugular e a artéria carótida foram dissecadas, para permitir a sangria e a injeção de látex natural branco juntamente com corante líquido de pigmento azul.

Após a constatação da pigmentação azulada na região abdominal e auricular, o animal foi submetido à tricotomia ampla do abdome, seguida da realização da celiotomia mediana pré-retroumbilical.

O segmento intestinal do jejuno, mais proximal à incisão, foi identificado, exteriorizado da cavidade e observado quanto à organização da vascularização

oriunda da artéria e veia mesentérica cranial. Após a identificação da artéria e veia mesentérica, determinou-se um ramo correspondente a artéria/veia marginal peri-intestinal extramural que irrigasse aproximadamente um segmento intestinal de 8,0 cm, para padronizar o local da clipagem (Figura 1).

Após a padronização, foi iniciada a etapa experimental cirúrgica.

2.3 - Procedimentos anestésicos

Os coelhos foram mantidos em jejum alimentar de 8 horas. Antecedendo o ato cirúrgico, foram administrados fármacos sedativos, associando Xilazina (2,5mg/kg/IM) e Cetamina (25mg/kg/IM). A veia auricular marginal foi cateterizada para a instituição de fluidoterapia e realização de medicação analgésica com Cloridrato de Tramadol (1,0 mg/kg/IM). Após a perda dos reflexos palpebrais e laringotraqueais, realizou-se a intubação orotraqueal para permitir a manutenção anestésica pela inalação dose efeito de isoflurano. A artéria auricular central foi cateterizada.

O paciente foi posicionado em decúbito dorsal, apoiado sobre calha cirúrgica e realizou-se tricotomia ampla da região abdominal.

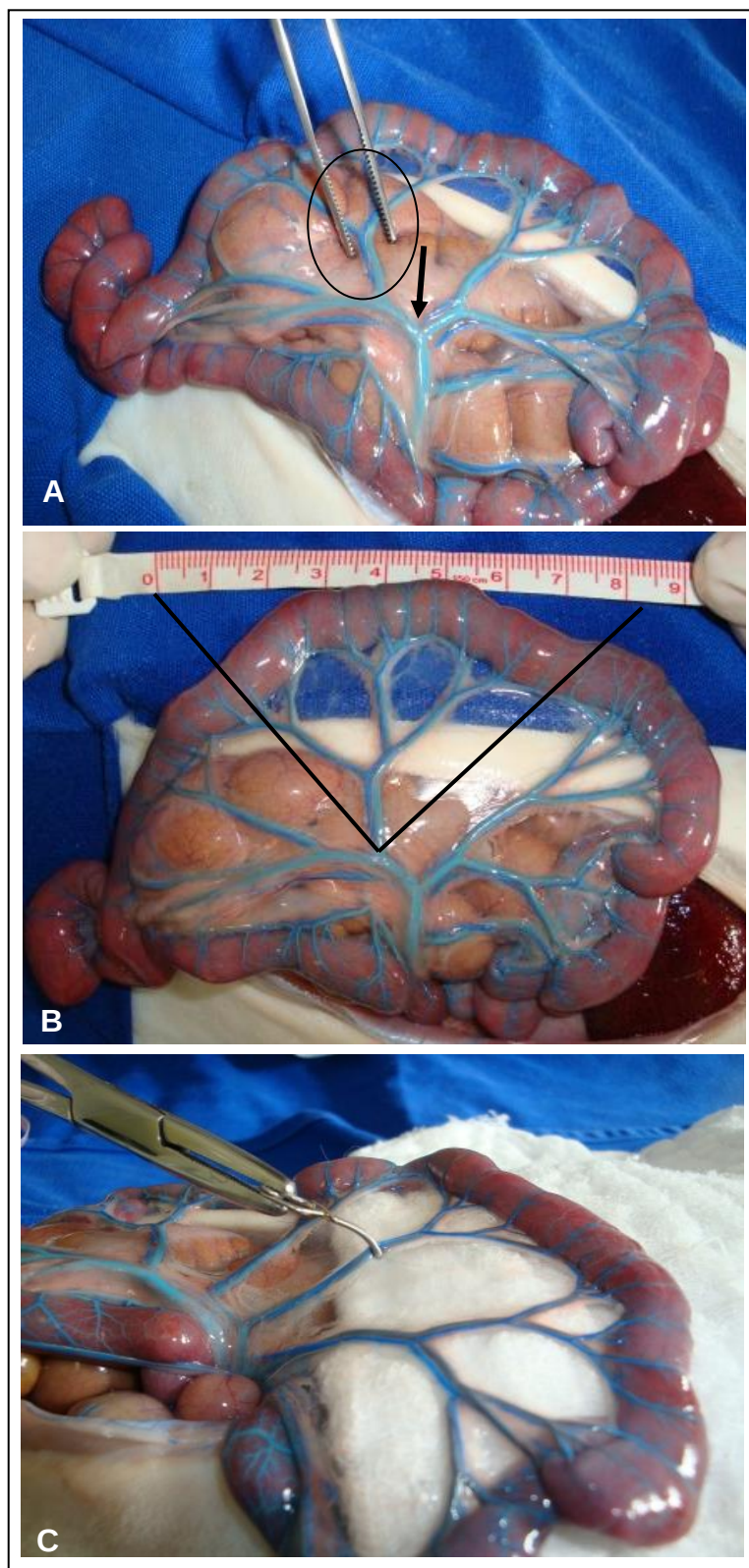


Figura 1: Avaliação da irrigação mesentérica do jejunum de coelho após a realização da técnica de injeção de látex natural branco juntamente com corante líquido de pigmento azul. A) Identificação da irrigação proveniente da artéria e veia mesentérica cranial (seta) de intestino delgado (jejuno) e de ramo da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural (círculo), destacando a cor azul escura para o ramo arterial e azul claro para ramo venoso. B) Mensuração do perímetro irrigado pelo segmento identificado; C) Clipagem da artéria e veia marginal peri-intestinal extramural utilizando clipe vascular.

2.4 – Procedimento cirúrgico

O campo cirúrgico foi preparado realizando antissepsia com álcool 70% e clorexidine tópico 2% e os panos cirúrgicos foram posicionados. Foi realizada celiotomia mediana pré-retroumbilical, de aproximadamente 6,0 cm, no sentido crânio caudal. O segmento intestinal do jejuno, mais proximal à incisão, foi identificado, exteriorizado da cavidade, identificou-se o ramo da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural e realizou a oclusão utilizando clipe vascular (Figura 2).



Figura 2- Clipes vasculares utilizados durante a celiotomia mediana pré-retroumbilical de coelhos Nova Zelândia, para promover a obstrução do fluxo sanguíneo da marginal peri-intestinal extramural. (escala = 1cm).

O tempo de oclusão variou conforme o grupo experimental. Durante o intervalo de tempo da oclusão, os animais permaneceram anestesiados e tiveram a cavidade abdominal suturada por pontos separados, para evitar perda de fluido abdominal e contaminação. Não foi realizada mensuração que permitisse comprovar a ausência e o retorno do fluxo sanguíneo. Ainda a circulação sanguínea colateral foi mantida. Após a remoção do clipe vascular, a fáscia muscular foi aproximada com pontos tipo Sultán (X) utilizando fio de sutura Nylon 1, o tecido subcutâneo com sutura simples contínua utilizando o fio de sutura Vicryl 0 e a pele foi aproximada por sutura intradérmica, utilizando fio de sutura Nylon 0.

2.5 – Grupos experimentais

Os animais foram numerados do 1 ao 36 e foram aleatoriamente distribuídos, por meio de sorteio, nos grupos experimentais contendo seis animais (Tabela 1). A ordem das cirurgias obedeceu à numeração pré-estabelecida. Os tempos de

isquemia e/ou reperfusão foram estabelecidos e adaptados dos modelos propostos por GAO et al. (2006), JIANG et al. (2011) e BARRIGA et al. (2013). Durante todo o tempo de isquemia e/ou reperfusão, o segmento intestinal foi mantido dentro da cavidade abdominal.

- Grupo Sham (Sham): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, sem a realização da oclusão dos vasos. Os animais permaneceram anestesiados por uma hora, após esse tempo foram coletados fragmentos intestinais para realização de exames e realizada a eutanásia dos animais por sobredosagem anestésica.

- Grupo Isquemia (I) tempo uma hora (I1H): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 1 hora. Os animais permaneceram anestesiados por 1 hora, após esse tempo foram coletados fragmentos intestinais para realização de exames e realizada a eutanásia dos animais por sobredosagem anestésica.

- Grupo Isquemia (I) tempo duas horas (I2H): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 2 horas. Os animais permaneceram anestesiados por duas horas, após esse tempo foram coletados fragmentos intestinais para realização de exames e realizada a eutanásia dos animais por sobredosagem anestésica.

- Grupo Isquemia uma hora/Reperfusão duas horas (I1H/R2H): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 1 hora. Os animais permaneceram anestesiados por uma hora e após esse tempo foi removido o clipe vascular e realizado um ponto com fio polipropileno 4-0 de cor azul no mesentério próximo ao local da clipagem. A anestesia foi cessada, o paciente foi levado à local de recuperação anestésica, permanecendo vivo por duas horas. Após esse tempo foram anestesiados e operados novamente, foram coletados fragmentos intestinais para realização de exames e após, foi realizada a eutanásia dos animais por sobredosagem anestésica.

- Grupo Isquemia duas horas/Reperfusão uma hora (I2H/R1H): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento

intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 2 horas. Os animais permaneceram anestesiados por duas horas e após esse tempo foi removido o clipe vascular e realizado um ponto com fio polipropileno 4-0 de cor azul no mesentério próximo ao local da clipagem. A anestesia foi cessada, o paciente foi levado à local de recuperação anestésica, permanecendo vivo por uma hora. Após esse tempo foram anestesiados e operados novamente, foram coletados fragmentos intestinais para realização de exames e após, foi realizada a eutanásia dos animais por sobredosagem anestésica.

- Grupo Isquemia duas horas/Reperusão cinco horas (I2H/R5H): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 2 horas. Os animais permaneceram anestesiados por duas horas e após esse tempo foi removido o clipe vascular e realizado um ponto com fio polipropileno 4-0 de cor azul no mesentério próximo ao local da clipagem. A anestesia foi cessada, o paciente foi levado à local de recuperação anestésica, permanecendo vivo por cinco horas. Após esse tempo foram anestesiados e operados novamente, foram coletados fragmentos intestinais para realização de exames e após, foi realizada a eutanásia dos animais por sobredosagem anestésica.

2.6 - Avaliação macroscópica transcirúrgica

Antes e após a realização da clipagem da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural foi avaliado o aspecto macroscópico do segmento irrigado pelo ramo ocluído e dos segmentos adjacentes, quanto à coloração e peristaltismo (teste de beliscamento). Os achados macroscópicos foram comparados entre os animais de um mesmo grupo, e entre os grupos.

Tabela 1: Resumo/delineamento proposto para a confecção dos grupos experimentais.

Grupo	Nº de animais	Tempo Isquemia/Reperusão	Eutanásia (Momentos/tempo)
Sham	6	_____	1h após o início da celiotomia
I1H	6	1 hora	Em seguida ao término do procedimento
I2H	6	2 horas	Em seguida ao término do procedimento
I1H/R2H	6	1 hora / 2 horas	Animal acordado, novamente anestesiado, após 2 horas de reperusão
I2H/R1H	6	2 horas / 1 hora	Animal acordado, novamente anestesiado, após 1 hora de reperusão
I2H/R5H	6	2 horas / 5 horas	Animal acordado, novamente anestesiado, após 5 horas de reperusão

2.7 - Exame Histopatológico

Foi coletado fragmento intestinal de jejuno, de aproximadamente 0,5 cm de extensão, forma tubular e enrolados em gaze, de região central acometida pela lesão isquêmica previamente marcada através de um ponto de sutura com fio polipropileno 4-0. As coletas foram realizadas com auxílio de lâmina de bisturi, e a cada animal a lâmina era trocada por outra nova. Após as coletas, os animais foram submetidos à eutanásia.

Todos os fragmentos extraídos foram fixados em formol 10% e incorporados em parafina. Os tecidos foram seccionados em cortes de aproximadamente 4-5 µm para confecção de lâminas histológicas e coradas por hematoxilina e eosina.

Foram avaliados histologicamente no mínimo seis campos escolhidos de forma aleatória, e com base em Jiang et al. (2011) por lâmina de cada animal e para cada segmento e considerado a mediana de eventos para se classificar estas lesões em escores. O avaliador desconhecia os grupos avaliados. As avaliações foram realizadas com as objetivas de 10x e 40x.

A classificação histopatológica das lesões intestinais do fragmento isquêmico foi estabelecida de acordo com o escore proposto por Chiu et al. (1970) adaptado demonstrado na tabela 2 e Pagliosa et al. (2009) adaptado, demonstrado nas tabelas 3 e 4. Para avaliar presença de processo inflamatório estabeleceu-se um escore proposto na tabela 5. Realizou-se também análise descritiva das lesões encontradas em cada grupo.

Tabela 2: Escore para lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

ESCORE	LESÃO
0	Mucosa sem alteração.
1	Vilosidades preservadas sem lise celular, sem processo inflamatório (PI), com espaço subepitelial (ES).
2	Lise celular, com ES, espaçamento aumentado entre as vilosidades.
3	Desnudamento de vilosidade, com células inflamatórias (CI), capilares dilatados.
4	Destruição estrutural da vilosidade, com CI, necrose e ulceração glandular basal.
5	Destruição total da mucosa.

Adaptado Chiu et al. (1970)

Tabela 3: Escore para edema, hemorragia e presença de polimorfonucleares nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

ESCORE	EDEMA/ HEMORRAGIA/ PRESENÇA DE POLIMORFONUCLEARES
0	Ausente.
1	Incipiente.
2	Leve.
3	Moderado.
4	Intenso.

Adaptado Pagliosa et al. (2009)

Tabela 4: Escore para dilatação de vasos linfáticos nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural

ESCORE	DILATAÇÃO DE LINFÁTICOS
0	Ausente
1	Moderado
2	Intenso

Adaptado de Pagliosa et al. (2009)

Tabela 5: Escore para processo inflamatório mononuclear nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

ESCORE	PROCESSO INFLAMATÓRIO MONONUCLEAR
0	Ausente
1	Incipiente
2	Leve
3	Moderado
4	Intenso

2.8 - Análise estatística

Para testar a normalidade dos dados histopatológicos classificados em escores foi utilizado teste de Kolmogorov-Smirnov. Após, os dados foram avaliados usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn, considerado significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPadPrism5®, com objetivo de avaliar a inflamação do momento proposto em cada grupo sobre as características histopatológicas dos fragmentos intestinais

3- RESULTADOS

O procedimento de indução anestésica foi realizado de forma a não causar excitação dos animais para que a função hemodinâmica e respiratória mantivesse estável até o momento de realização do procedimento. Em alguns animais não foi possível realizar intubação, portanto estes foram mantidos com auxílio de máscara. Não se observou quaisquer complicações anestésicas.

Nos animais alocados no grupo Sham, submetidos apenas a celiotomia, observou-se após uma hora de anestesia que todos apresentavam coloração de serosa intestinal rósea, sem alteração, ocorrendo apenas um pequeno sangramento no momento da coleta do fragmento intestinal, que foi considerado normal.

A clipagem da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural permitiu a oclusão de fluxo sanguíneo em um segmento de aproximadamente 8 cm de extensão, proporcionando após o período de uma e/ou duas horas, alterações de coloração de serosa intestinal, sugerindo congestão, e hipomotilidade. As regiões adjacentes (10 cm cranial e 10 cm caudal) à área irrigada apresentavam-se levemente alteradas. O grupo I2H apresentou aspecto de serosa mais avermelhada com vasos sanguíneos mais evidentes, congestos e hiperêmicos do que observado no grupo I1H (Figura 3).

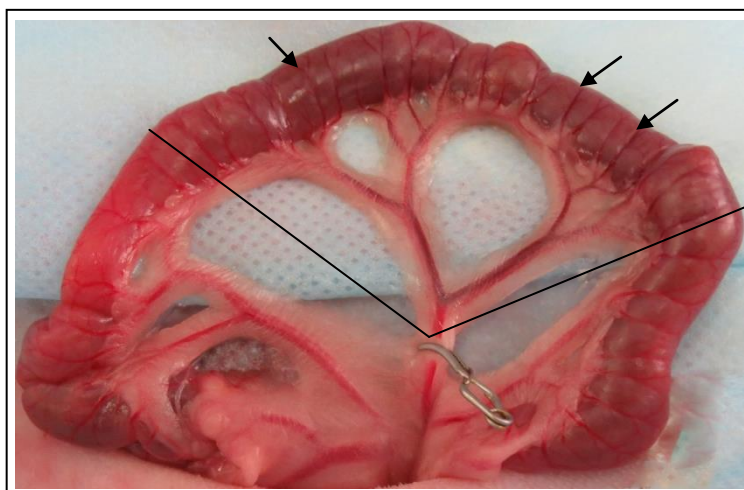


Figura 3: Segmento intestinal de jejuno submetido à oclusão da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural de animal alocado no grupo submetido a duas horas de isquemia (I2H). Em destaque região intestinal irrigada pelo ramo vascular ocluído serosa mais avermelhada, com vasos sanguíneos hiperêmicos.

Nos grupos submetidos à reperfusão, as alterações macroscópicas após a remoção do clipe vascular foram semelhantes às observadas nos grupos I1H e I2H.

Porém o grupo I1H/R2H, minutos após a desobstrução, observou-se que a hiperemia havia reduzido, retornando ao aspecto próximo do normal.

Ao ser realizado novamente a celiotomia após a reperfusão, observou-se diminuição da resposta ao teste de beliscamento, sugerindo hipomotilidade intestinal, além de sangramento excessivo no momento da coleta dos fragmentos. No grupo I2H/R5H notou-se serosa mais pálida, aumentada de espessura e com aspecto brilhante, sugerindo edema (Figura 4). As regiões adjacentes ao local de lesão apresentaram aspecto de serosa mais avermelhada e presença de vasos sanguíneos pouco mais evidentes.

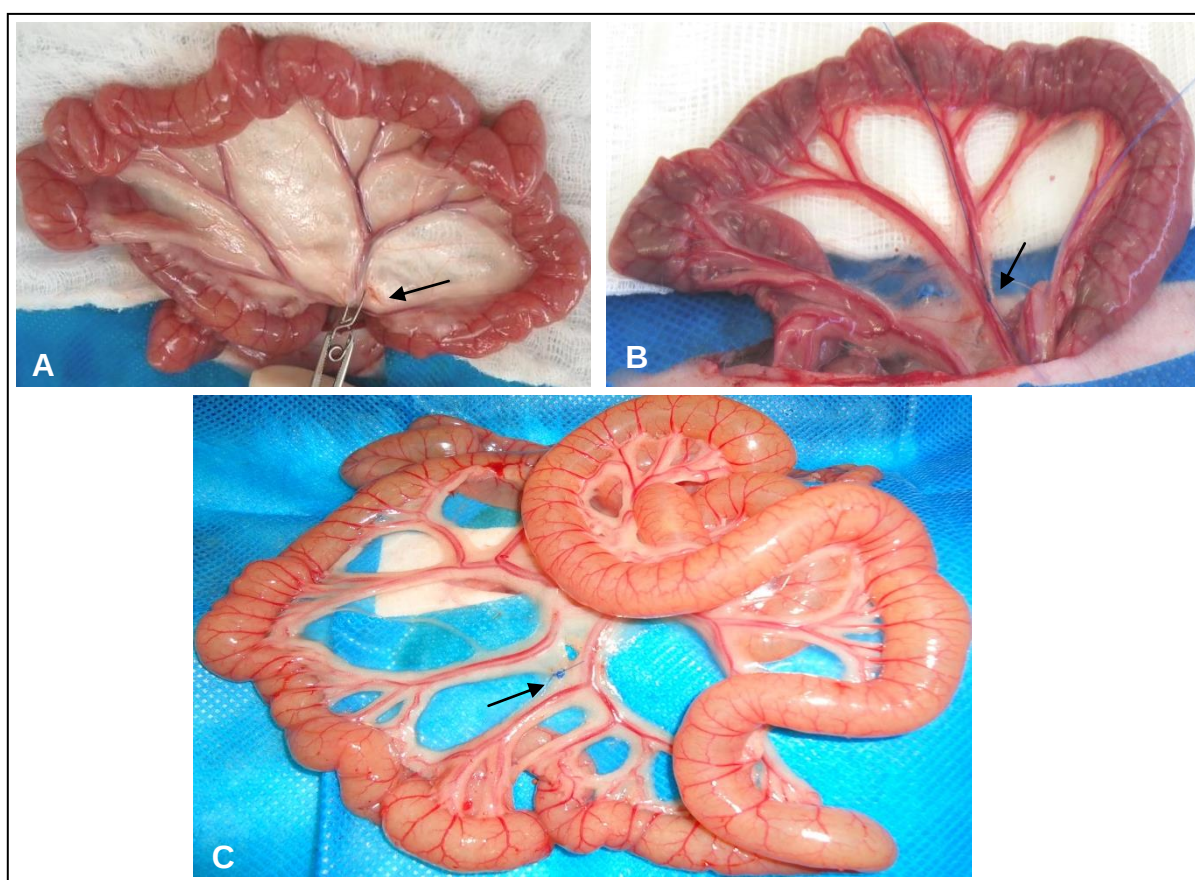


Figura 4: Segmento intestinal de jejuno de animal alocado no grupo submetido a duas horas de isquemia e cinco horas de reperfusão (I2H/R5H). A) Aspecto intestinal normal, com serosa rósea imediatamente anterior a oclusão da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural por clipe vascular (seta). B) Aspecto intestinal exibindo serosa isquêmica, vasos extramurais congestionados, imediatamente após a remoção do clipe vascular, e sutura do mesentério com fio não absorvível azul para marcação do local isquemiado (seta). C) Aspecto intestinal exibindo serosa mais pálida, aumentada de espessura e com aspecto brilhante e vasos extramurais hiperêmicos, sugerindo edema, cinco horas após reperfusão. Destaque (seta) para a sutura de mesentério indicando local da oclusão do vaso sanguíneo.

Histologicamente, considerando as lesões em mucosa intestinal, observou-se que quanto maior o tempo de reperfusão, mais frequente foi a presença de

desnudamento de vilosidade, com células inflamatórias (CI), capilares dilatados (escore 3), contudo, em nenhum grupo experimental observou-se destruição total da mucosa.

Estatisticamente, os grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H obtiveram diferença significativa para o grupo Sham (Figura 5); e dos grupos I2H/R1H e I2H/R5H (Figura 6) apresentaram diferença significativa para o grupo I1H. As demais alterações estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Resultados, em escore, das análises histológicas de lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural, segundo Chiu et al. (1970) adaptado.

COELHOS	ESCORE PARA LESÃO EM MUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	1	1	2	2	3
2	0	1	1	2	2	3
3	0	1	1	2	2	3
4	0	1	1	1	2	3
5	0	1	1	2	2	3
6	0	1	1	1	2	3
Mediana	0 ^a	1 ^a	1 ^{abc}	2 ^{bc}	2 ^b	3 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

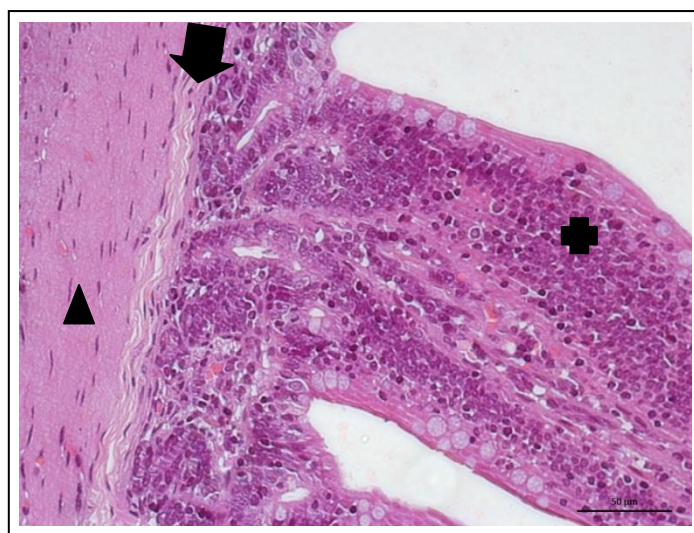


Figura 5: Fotomicrografia de animal alocado no grupo Sham exibindo aspectos histopatológicos normais das camadas mucosa (■), submucosa (seta) e muscular (triângulo) de segmento intestinal.



Figura 6: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H exibindo formação de espaço subepitelial em região apical de mucosa no segmento intestinal.

Com relação a erosão de mucosa, a maioria das amostras observadas constatarem ausência de erosão (escore 0) e com alguns animais dos grupos submetidos à reperusão apresentando separação entre o epitélio e a lâmina própria na extremidade das vilosidades (escore 1).

Para a variável edema de mucosa avaliado, os grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H apresentaram padrão de classificação leve (escore 2) e foram significativamente diferentes do grupo Sham. Ainda o grupo I2H/R5H apresentou também diferença em relação ao grupo I1H. As alterações estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7: Resultados, em escore, das análises histológicas de edema em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA EDEMA EM MUCOSA					
	SHAM	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	0	2	2	2	2
2	0	0	1	2	2	2
3	0	1	0	2	2	2
4	0	1	1	1	2	2
5	0	0	2	2	1	2
6	0	1	1	2	2	2
Mediana	0 ^a	0,5 ^{ac}	1 ^{abc}	2 ^{bc}	2 ^{bc}	2 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Considerando a variável hemorragia em mucosa, a maioria das observações foram graduadas no escore 0, isto é, ausentes, com raros achados de hemorragia incipiente (escore 1). Não houve diferença estatística entre os grupos. As alterações estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8: Resultados, em escore, das análises histológicas de hemorragia em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA HEMORRAGIA EM MUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	0	0	0	1	1
2	0	0	0	1	1	2
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	1
5	0	0	0	1	0	1
6	0	0	0	0	1	0
Mediana	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Quanto a presença de infiltrado de polimorfonuclear, observaram-se mais frequentemente graus leves (escore 2) a moderados (escore 3), sobretudo nos grupos submetidos à reperfusão. Houve diferença estatística dos grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H em relação ao grupo Sham. Também houve diferença do grupo I2H/R5H para grupo I1H ($p < 0,05$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9: Resultados, em escore, das análises histológicas da presença de PMN em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA PRESENÇA DE PMN EM MUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	1	4	3	3	3
2	0	2	2	3	3	3
3	0	1	2	2	3	3
4	1	1	2	2	3	4
5	0	2	2	3	2	4
6	1	1	2	3	3	3
Mediana	0 ^a	1 ^{ac}	2 ^{abc}	3 ^{bc}	3 ^{bc}	3 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Para a variável dilatação de linfático em mucosa, nos grupos reperfusão observou-se dilatação intensa (escore 2) (Figura 7), sobretudo quando comparada com graus ausentes (escore 0) e moderados (escore 1) presente nos animais do grupo Sham e I1H. O grupo I2H foi significativamente diferente do grupo Sham ($p < 0,01$). Os grupos I2H/R1H e I2H/R5H obtiveram diferença significativa do grupo Sham. As demais alterações estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10: Resultados, em escore, das análises histológicas de dilatação de linfático em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA DILATAÇÃO LINFÁTICA EM MUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	2	2	1	2	2
2	0	1	1	1	2	2
3	0	1	1	2	2	2
4	0	1	2	1	2	2
5	0	1	2	2	1	1
6	0	1	2	1	1	2
Mediana	0 ^a	1 ^{abc}	2 ^c	1 ^{abc}	2 ^{bc}	2 ^{bc}

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

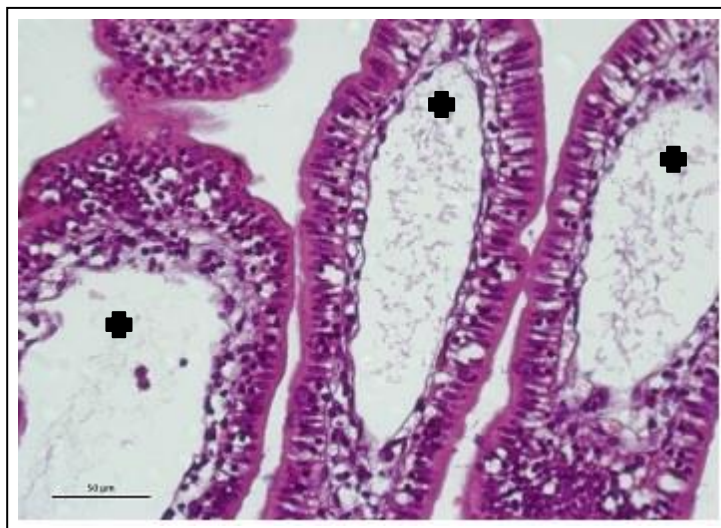


Figura 7: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R1H exibindo dilatação linfática em mucosa intestinal (■) leve/moderada, classificada como escore 2.

Não foi observada a presença de processo inflamatório mononuclear em nenhum corte histológico. Além dos quesitos avaliados, durante a avaliação histológica dos grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H evidenciou-se a presença de vilosidades encurtadas de tamanho em relação ao grupo Sham.

As observações histopatológicas de submucosa evidenciaram edema presente em graus moderado (escore 3) a intenso (escore 4) consequente ao aumento de tempo de isquemia e/ou reperfusão (Figura 8). Os grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H foram significativamente diferentes em relação ao grupo Sham.

Também houve diferença entre os grupos I2H/R1H e I2H/R5H do grupo I1H ($p < 0,05$; $p < 0,01$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11: Resultados, em escore, das análises histológicas de edema em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA EDEMA EM SUBMUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	0	2	3	3	4
2	0	0	1	3	3	3
3	0	1	1	2	3	4
4	0	1	2	3	3	4
5	0	0	2	3	3	4
6	0	1	2	3	3	3
Mediana	0 ^a	0,5 ^{ac}	2 ^{abc}	3 ^{bc}	3 ^b	4 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Para hemorragia em submucosa o grupo I2H/R5H foi significativamente diferente aos demais grupos do estudo ($p < 0,05$), pois foi o único no qual se observou hemorragia incipiente (escore 1). Nos demais grupos, a hemorragia em submucosa estava ausente.

A presença de infiltrado polimorfonuclear (PMN) em submucosa foi similar aos dados evidenciados em mucosa, os quais os maiores tempos de isquemia e reperfusão implicaram em graus moderados (escore 3) de PMN. Houve diferença significativa dos grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H em relação ao grupo Sham. Também houve diferença significativa entre os grupos I2H/R1H e I2H/R5H para o grupo I1H. As demais alterações estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 12: Resultados, em escore, das análises histológicas da presença de PMN em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA PRESENÇA DE PMN EM SUBMUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	0	2	3	2	3
2	0	0	1	3	2	3
3	0	0	0	2	2	3
4	0	1	2	2	3	3
5	0	1	1	2	2	2
6	1	0	1	3	3	2
Mediana	0 ^a	0 ^{ac}	1 ^{abc}	2,5 ^b	2 ^{bc}	3 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.



Figura 8: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I1H/R2H exibindo edema de submucosa intestinal moderado (barra), classificada como escore 3.

Em relação à dilatação de vasos linfático em submucosa também evidenciou-se que os maiores tempos de isquemia e reperfusão implicaram em graus leves (escore 2) de dilatação (Figura 9). Houve diferença significativa dos grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H em relação ao grupo Sham. As demais alterações estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13: Resultados, em escore, das análises histológicas de dilatação de linfático em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e/ou reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA DILATAÇÃO LINFÁTICA EM SUBMUCOSA					
	Sham	I1H	I2H	I1H/R2H	I2H/R1H	I2H/R5H
1	0	1	1	1	2	2
2	0	1	1	1	2	2
3	0	2	1	2	2	2
4	0	1	1	2	1	2
5	0	1	1	1	1	2
6	0	1	2	1	2	1
Mediana	0 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^b	2 ^b	2 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

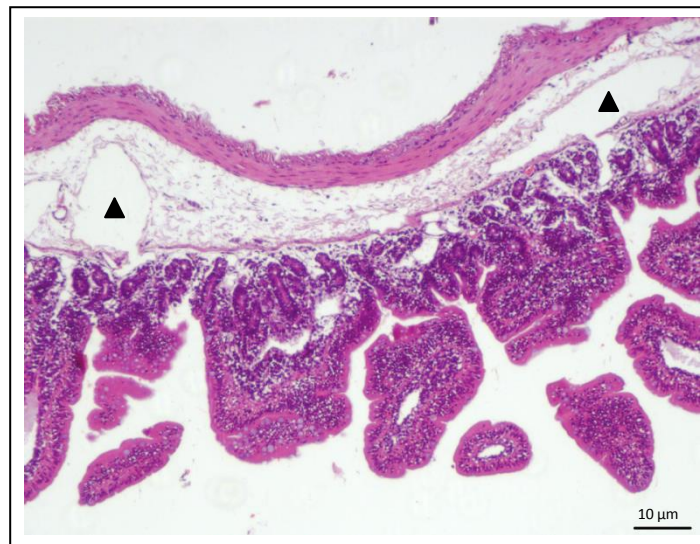


Figura 9: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H exibindo dilatação intensa de vasos linfáticos (triângulo) em submucosa intestinal, classificada como escore 2.

4- DISCUSSÃO

Existem descritos na literatura trabalhos experimentais para compreensão da fisiopatologia e estabelecimento de terapias para lesões de isquemia e reperfusão (YASSIN et al., 1997; CHANG et al. 2005; RIBEIRO & YOSHIDA, 2005). Entretanto, quando iniciou-se o estudo piloto do presente projeto, constatamos discrepância de resultados encontrados daqueles descritos por autores de metodologia similar à empregada. Esta dificuldade em reproduzir os dados levou a realização deste trabalho, visando à obtenção de um modelo experimental de fácil reprodução, com resultados histopatológicos bem elucidados e que permitisse a inferência de tempos para isquemia e reperfusão que acarretasse uma lesão moderada, contudo compatível com a vida do paciente e ainda com potencial para reparação.

Vários estudos realizados a fim de elucidar as lesões de I/R, propõe como metodologia de indução isquêmica pela oclusão da artéria mesentérica cranial (GUIMARÃES et al., 2002; GAO et al., 2006; JIANG et al., 2011; BOYBEYIET al., 2014) que acarretam numa lesão intestinal generalizada. Todavia, quando se considera eventos que ocorrem no organismo, constata-se que algumas afecções intestinais, primárias ou secundárias, levam ao desenvolvimento de lesões intestinais segmentadas, podendo ou não assumir um caráter sistêmico. A manipulação intestinal realizada para execução de modelos descritos por estes autores acima citados demonstrou-se pouco eficiente, muitas vezes ocorrendo lesões de manipulação devido à delicadeza do órgão.

Considerando esses motivos, optou-se por realizar a oclusão de apenas um ramo vascular da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural e constatamos que esse modelo proposto foi capaz de causar lesões intestinais em mucosa e submucosa em coelhos, e ao mesmo tempo evitar o excesso de manipulação do intestino. Guan et al. (2009), em um estudo experimental de lesão de I/R intestinal em ratos, também realizaram a oclusão da artéria marginal peri-intestinal extramural, durante 15 e 50 minutos, mas associaram essa oclusão à obstrução do suprimento sanguíneo colateral do segmento. Mesmo utilizando tempo de isquemia menor do que aquelas utilizadas no presente estudo, às alterações histopatológicas que os autores observaram foram mais severas, possivelmente pela falta de vascularização colateral.

A tolerância ao insulto de isquemia intestinal também pode variar de acordo com as diferentes espécies. Estudos experimentais com ratos e camundongos apresentaram alterações histopatológicas em situações isquêmicas com duração de 30 minutos (GUIMARÃES et al., 2002); 45 minutos (JIANG et al., 2011); 15 e 50 minutos (GUAN et al., 2009) e 60 minutos (BOYBEYI et al., 2014) enquanto, para cães esse tempo isquêmico foi de 60 minutos (CHIU et al., 1970), para coelhos apenas a partir de 60 minutos (GAO et al., 2006) e para equinos a partir de 70 minutos (DABAREINER et al., 2001) e 120 minutos (PAGLIOSA et al., 2009).

Macroscopicamente, foi possível notar aspecto avermelhado em serosa, e vasos sanguíneos congestos e hiperêmicos, bem evidentes no grupo I2H, similar ao que foi encontrado por Pagliosa et al. (2009), em equinos, duas horas após isquemia. No grupo I2H/R5H foi observado ao final do tempo de reperfusão aumento na espessura da serosa sugerindo edema. Tal fato pode estar relacionado à pressão hidrostática aumentada (VASCONCELOS, 2002).

Histologicamente, as lesões intestinais que foram evidenciadas pela avaliação histológica de mucosa foram compatíveis com a classificação proposta por Chiu et al. (1970). Aplicando a classificação proposta, evidenciamos que o grupo I1H/R2H obteve escore de lesão entre 1 a 2 (valor de mediana 2) enquanto Gao et al. (2006) visualizaram destruição maciça das vilosidades e exposição da lâmina própria da mucosa (escore 5) após o clampeamento da artéria mesentérica cranial por uma hora seguida de reperfusão por duas horas.

No presente estudo não foi detectado a presença relevante de erosão em mucosa. Apenas nos grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H foi possível visualizar alguns locais de erosão, mas, consideradas incipientes pelo avaliador. Em um estudo realizado por Pagliosa et al. (2009) com equinos, essas mesmas lesões foram descritas de forma bem mais evidente, e através deste afirmaram que as lesões iniciaram-se durante a isquemia e mantiveram-se durante a reperfusão.

Ainda, no estudo de Pagliosa et al. (2009) com equinos, o grupo em que foi realizada oclusão venosa para causar a lesão de I/R em jejuno, apresentou alterações de hemorragia e edema em mucosa e submucosa em abundância, divergindo dos grupos I1H/R2H, I2H/R1H que apresentaram hemorragia em mucosa com escore 0 a 1, e do grupo I2H/R5H com escore 0 a 2 para mucosa e escore 1 para submucosa. A ocorrência de hemorragia pode estar relacionada ao aumento da

permeabilidade vascular em situação de hipóxia que irá causar lesão nas células endoteliais, seja na fase isquêmica ou de reperfusão (DABAREINER et al., 2001). Vale a pena salientar que apesar de serem animais diferentes, equinos e coelhos, foram submetidos a procedimento com a mesma finalidade, de induzir a lesão intestinal.

As presenças de edema e dilatação linfática em mucosa e submucosa foram mais evidentes nos grupos I1H/R2H, I2H/R1H e I2H/R5H. Estes resultados sugerem que a lesão de reperfusão aumenta as lesões causadas inicialmente pelo insulto isquêmico e que as lesões vasculares existentes poderão ser agravadas pelo aumento da pressão hidrostática capilar, podendo também contribuir para formação de edema (YASSIN et al., 1997; CARDEN & GRANGER, 2000; CHANG et al., 2005).

Por se tratar de uma lesão aguda, a presença de infiltrado polimorfonuclear foi evidenciada em todos os grupos, com exceção do grupo Sham. O tipo celular observado foi o heterófilo, uma célula redonda, com núcleo multilobado, de coloração acidófila de função inflamatória similar ao neutrófilo, porém apresenta esta nomenclatura particular aos coelhos. A presença de PMN pode ser atribuída ao fato de haver produção de radicais livres de oxigênio (RLO) durante a reperfusão, provocando peroxidação lipídica e danos celulares que culminarão com o aumento da resposta inflamatória no local de lesão (MOORE et al., 1995; ZHAO et al., 2003; GAO et al., 2006; JIANG et al., 2011). No entanto, a presença incipiente de processo inflamatório mononuclear pode ser justificada pelo padrão agudo de lesão, não havendo tempo necessário para sua formação.

Em nenhum grupo experimental foi observado destruição de mucosa e vilosidades associadas com graus intensos de edema, hemorragia e presença de heterófilos polimorfonucleares, porém o grupo I2H/R5H apresentou maior índice de lesões, classificados de forma geral como moderado. Fatos que nos permitem inferir que apesar das lesões apresentadas no presente trabalho serem compatíveis com injúria de isquemia e reperfusão, o organismo ainda preserva potencial de reparação.

5- CONCLUSÃO

O modelo experimental proposto proporcionou lesões de mucosa e submucosa em segmento intestinal, onde o fluxo sanguíneo foi ocluído pela clipagem da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural. As alterações histopatológicas incluíram a observação de desnudamento de vilosidades, edema, hemorragia, dilatação de vasos linfáticos e presença de infiltrado inflamatório que se acentuaram nos maiores tempos de isquemia e reperfusão empregados. Os animais submetidos à isquemia por duas horas seguido de reperfusão por cinco horas (I2H/R5H) compuseram o grupo experimental de fácil reprodução e apresentaram uma lesão intestinal moderada, contudo, compatível com a vida do paciente e ainda com potencial para reparação, a ser empregada na próxima etapa da pesquisa.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVGERINOS, E. D.; KOSTOPANAGIOTOU, G.; COSTOPANAGIOTOU, C.; KOPANAKIS, N.; ANDREADOU, I.; LEKKA, M.; NAKOS, G.; SMYIRNIOTIS, V. Intestinal preconditioning ameliorates ischemia-reperfusion induced acute lung injury in rats: an experimental study. **Journal of Surgical Research**, v. 160, p. 294-301, 2010.
- BARRIGA, A.; MEDRANO, M.; DE JUAN, J.; BURGOS, J. Intravenous infusion of adult adipose tissue stem cells for repairing spinal cord ischaemic lesions. An experimental study on animals. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología**, v. 57, p. 89-94, 2013.
- BEN, D. F.; YU, X. Y.; JI, G. Y.; ZHENG, D. Y.; LV, K. Y.; MA, B.; XIA, Z. F. TLR4 mediates lung injury and inflammation in intestinal ischemia-reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 174, p. 326-333, 2012.
- BOYBEYI, O.; GUNAL, Y. D.; ATASOY, P.; KISA, U.; ASLAN, M. K. The effect of colchicine and low-dose methotrexate on intestinal ischemia/ reperfusion injury in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, 2014. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.01.057.
- CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 255-266, 2000.
- CHANG, J. X.; CHEN, S.; MA, L. P.; JIANG, L. Y.; CHEN, J. W.; CHANG, R.M.; WEN, L. Q.; WU, W.; JIANG, Z. P.; HUANG, Z. T. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 5485–5491, 2005.
- CHIU, C. J; SCOTT, H. J; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. II. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate. **Archieve of Surgery**, v. 101, p. 484, 1970.
- DABAREINER, R. M.; SULLINS, K. E.; WHITE, N. A.; SNYDER JR. Serosal injury in the equine jejunum and ascending colon after ischemia reperfusion or intraluminal distention and decompression. **Veterinary Surgery**, v. 30, p. 114-125, 2001.
- GAO, C. J.; CHAI, W.; XU, L.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; HAN, L.; SUN, X. Protective effects of hyperoxygenated solution preconditioning on intestinal ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Journal of Surgical Research**, v. 135, p. 268-274, 2006.
- GUAN, Y.; WOTTELL, R. T.; PRITTS, T. A.; MONTRESEL, M. H. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, p. 187-196, 2009.
- GUIMARAES, F. A.; TAHA, M. O.; SIMOES, M. J.; FAGUNDES, D. J. Ischemia- reperfusion of the small intestine and hyperbaric oxygen treatment: a morphologic study in rats. **Transplantation Proceeding**, v. 34, p. 977- 979, 2002.
- JIANG, H.; QU, L.; LI, Y.; GU, L.; SHI, Y.; ZHANG, J.; ZHU, W.; LI, J. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 168, p. 127-134, 2011.
- KOSTOPANAGIOTOU, G.; AVGERINOS, E.; COSTOPANAIOTOTU, C.; ARKADOPOULOS, N.; ANDREADOU, I.; DIAMANTOUPPOULOU, K.; LEKKA, M.; SMYRNIOTIS, V.; NAKOS, G. Acute lung injury in a rat model of intestinal Ischemia-Reperfusion: the potential time depended role of phospholipases A2. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 108-116, 2007.

- 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. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, p. 115-132, 1995.
- PAGLIOSA, G. M; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R.; MATOS, J. R. T. D.; TORRES, M. B.; MENDES, H. M. F.; COSTA, R. S. Use of glutamine to treatment of ischemia and reperfusion lesions in equine jejune. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 246-252. 2009.
- RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 4, p. 183 – 194, 2005.
- RITZ, J. P.; GERMER, C. T.; BUHR, H. J. Prognostic factors for mesenteric infarction: multivariate analysis of 187 patients with regard to patient age. **Annals of Vascular Surgery**, v.19, p.328-34, 2005.
- SANTOS, C. H.; GOMES, O. M.; PONTES, J. C.; MIJJI, L. N.; BISPO, M. A. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, p. 22–28, 2008.
- 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.
- YASSIN, M.M.; BARROS, D'SA. A. A.; PARKS, T. G.; McCAIGUE, M. D.; LEGGETT, P.; HALLIDAY, M. I.; ROWLANDS, B. J. Lower limb ischaemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function. **The British Journal of Surgery**, v.84, p.1425–1429, 1997.
- YURDAKAN, G.; TEKIN, I. O.; COMERT, M.; ACIKGOZ, S.; SIPAHI, E. Y. The presence of oxidized low-density lipoprotein and inducible nitric oxide synthase expression in renal damage after intestinal ischemia reperfusion. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 28, p. 16-22, 2012.
- ZHAO, Z.Q.; CORVERA, J. S.; HALKOS, M.E.; KERENDI, F.; WANG, N. P.; GUYTON, R. A.; VINTEN-JOHANSEN, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemicpreconditioning. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, p. H579-H588, 2003.

CAPÍTULO 3 - INFUSÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TERAPIA DA LESÃO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA

Oliveira, A.P.L.; Rangel, J.P.P.; Riodades, L. F.S.; Almeida, B. L.; Godoi, N.P.; Cruz, E.P.; E. Pereira Neto; Fiorio, W.A.B.; Monteiro, B.S.

RESUMO

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia da infusão células tronco mesenquimais (CTM) derivada de tecido adiposo sobre diminuição das lesões teciduais locais e remotas, causadas pelo evento de I/R intestinal experimental, em coelhos da raça Nova Zelândia. Para obtenção, cultivo e caracterização das CTM provenientes de tecido adiposo (ADCTM) foram utilizados 3 animais jovens. As células foram consideradas viáveis para terapia a partir da quarta passagem (fase *in vitro*). Para etapa *in vivo* foram utilizados 24 animais, adulto-jovens, pesando aproximadamente 3,5kg, divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, denominados IR Tratado com CTM (I2H/R5H CTM 3D; I2H/R5H CTM 7D); IR Tratado PBS (I2H/R5H PBS 3D; I2H/R5H PBS 7D). Os animais foram anestesiados e submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical. A artéria marginal peri-intestinal extramural foi localizada e clampeada (região predeterminada e padronizada) com auxílio de um clipe vascular, promovendo uma interrupção do fluxo sanguíneo durante 2 horas. Após esse período, o fluxo sanguíneo foi restabelecido, a anestesia inalatória suspendida e os animais despertados. Após 5 horas de reperfusão realizou-se os tratamentos por infusão endovenosa, conforme grupos experimentais. Os animais foram avaliados 72 horas e sete dias após o tratamento quanto ao aspecto macroscópico (coloração e peristaltismo) do segmento jejunal e por meio de avaliação histológica do segmento isquemiado quanto à presença ou ausência de destruição de mucosa intestinal, edema, hemorragia, dilatação de vasos linfáticos e presença de células inflamatórias polimorfonucleares, tanto em mucosa quanto submucosa. Os resultados observados revelaram que os grupos tratados com ADCTM obtiveram menores lesões em mucosa e submucosa quando comparados aos grupos tratados com PBS. Ainda os grupos tratados com ADCTM obtiveram resposta inflamatória controlada e maior taxa mitótica, resultados relacionados ao potencial terapêutico das CTM.

Palavras-Chave: lesões remotas, terapia celular, artéria marginal peri-intestinal extramural.

1- INTRODUÇÃO

As lesões de Isquemia/Reperusão (I/R) intestinais são consideradas eventos de grande relevância clínica, podendo causar danos locais e remotos (GAO et al., 2006; JIANG et al., 2011; VOLLMAR & MENDER, 2011; BEN et al., 2012). A isquemia intestinal pode ser classificada em isquemia mesentérica aguda, isquemia mesentérica crônica e colite isquêmica que irão culminar em diminuição do aporte sanguíneo tecidual e redução de oxigênio intestinal (ROWE & WHITE, 2002; YASUHARA, 2005; KASZAKI et al., 2006).

Sabendo que o intestino delgado é constituído por células lábeis, consideradas sensíveis ao insulto isquêmico, uma vez que ocorra a I/R intestinal, a função de barreira poderá se tornar prejudicada, podendo até mesmo levar a um quadro de translocação bacteriana (HUNG et al., 2004; CHEN et al., 2014), síndrome da resposta inflamatória sistêmica e falência múltipla dos órgãos (KUBIAK et al., 2010; MA et al., 2014).

Devido à alta taxa de mortalidade, 60-80% (RITZ et al., 2005; BOYBEYI et al., 2014) e morbidade, 60-100% (OLDENBURG et al., 2004; JIANG et al., 2011) causadas pela I/R intestinal, cada vez se faz mais necessário a realização de estudos a fim de se elucidar os mecanismos envolvidos no evento, bem como suas possíveis medidas terapêuticas (ROCHA et al., 2012).

Dentre as modalidades terapêuticas capazes de amenizar os efeitos prejudiciais locais e remotos da I/R, destaca-se o uso de medicações antioxidantes e antiinflamatórias (KOSTOPANAGIOTOU et al., 2007; AVGERINOS et al., 2010; YURDAKAN et al., 2012), utilização do propofol (VASILEIOU et al., 2012), chá verde (ABDEEN et al., 2011), hidrocortisona (ALVES et al., 2011), rutina (ITAGAKI et al., 2010), glutamina (PAGLIOSA et al., 2009), do azul de metileno (GRECA, et al., 2008), DMSO (DABAREINER et al., 2005), óleo de resina de copaíba (PAIVA et al., 2004), dentre outros.

Estudos com terapias celulares em doenças inflamatórias intestinais têm se tornado cada vez mais emergente devido a sua ação multifocal. Dentre as principais afecções que são alvos destes estudos, destacam-se as doenças inflamatórias intestinais, a síndrome do intestino curto, as lesões I/R. O termo “multifocal” usado para definir este tipo terapêutico está relacionado ao fato de estes diminuírem a

inflamação, reduzirem risco de infecção e estimularem o reparo tecidual (MANIERI & STAPPENBECK, 2011). Baseando-se nesses princípios, o emprego de células tronco mesenquimais (CTM) como método terapêutico das doenças intestinais (MANIERI & STAPPENBECK, 2011; JIANG et al., 2011) vêm sendo testado.

As células tronco mesenquimais (CTM) estão presentes em todos tecidos adultos, em região perivascular, porém em pequena quantidade (MEIRELLES et al., 2008). Estas são células multipotentes capazes de se aderir em substrato plástico, e diferenciar, *in vitro*, em diferentes tipos celulares tais como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (PITTENGER et al., 1999; MONTEIRO et al., 2008; MANIERI & STAPPENBECK, 2011). Também devido a esta característica de plasticidade, estas células são capazes de se diferenciar tanto *in vitro* ou *in vivo* (GIORDANO et al., 2007).

As células mesenquimais são capazes de promover imunomodulação através da estimulação de diversos fatores de crescimento, sendo estes o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento da insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento alfa (TGF- α). A ativação destes fatores irá causar a inibição da apoptose, aumento da angiogênese, estimula a mitose, proliferação e diferenciação destas células em órgãos precursores intrínsecos (JIANG et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de avaliações histopatológicas, se a infusão de células tronco mesenquimais alógenas, derivadas de tecido adiposo, por via intravenosa, irá atenuar as lesões locais e remotas provocadas pela I/R intestinal em coelhos submetidos experimentalmente a isquemia intestinal, após a oclusão da artéria mesentérica cranial.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo de ética: 294/2014 CEUA/UVV

2.1 - Animais de experimentação

Para estudo foram utilizados 27 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, de aproximadamente 10 semanas, com peso médio de 3,0 kg, alocados em um container modificado, de 12 metros de comprimento, revestido com PVC e isolamento térmico, ar condicionado e exaustor para controle de temperatura (aproximadamente 20°C) e temporizador elétrico mantendo fotoperíodo de 12/12 horas luz e escuro. Três animais foram utilizados na etapa *in vitro* do estudo e 24 animais foram alocados no estudo *in vivo*.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, distribuídos de forma aleatória, recebendo água *ad libitum* e 100 gramas/dia de ração comercial para roedores (Ração do Sítio Coelhão® - Guabi Nutrição Animal, Anápolis - Go).

2.2 - Cultura celular

O tecido adiposo foi coletado de 3 coelhos. Antecedendo a colheita, os animais foram mantidos em jejum alimentar de 12 horas, submetidos a medicação pré-anestésica com acepromazina (0,1 mg/kg/IV) associado a morfina (0,4mg/kg/IM) e após dez minutos, foram submetidos a tricotomia no membro torácico direito, região de esterno e abdômen. Em seguida, no centro cirúrgico, a veia auricular marginal foi cateterizada, e administrados os fármacos para indução anestésica: propofol (2mg/kg/IV) e midazolan (1mg/kg/IV). Após a perda dos reflexos, as amostras de tecido adiposo de aproximadamente 1,0 cm³ (1,0 grama) foram extraídas da região inguinal, sob condições assépticas, e armazenadas em tubo falcon de 50,0 mL contendo meio de cultura celular.

No fluxo laminar, esse tecido foi cortado em pequenos pedaços e transferido para outro tubo falcon de 15,0 mL contendo solução de collagenase do tipo I (Sigma, St Louis MO, USA), por 60 minutos, em estufa a 37°C, 5% de CO₂, agitado a cada 15 minutos. Posteriormente, o tubo foi centrifugação a 694G (2000 rpm), durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 10,0

mL meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de SFB (Soro Fetal Bovino) e esse volume dividido em cinco garrafas de cultura de 75 cm².

O volume de solução das garrafas foi acrescentado até completar 15,0 mL de DMEM completo, e as garrafas foram mantidas em estufa incubadora à 37° C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. As células foram monitoradas diariamente, em microscópio invertido de contraste de fase, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 a 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após permanecerem em estufa, quando foi identificada a confluência de 80%, o meio de cultura foi totalmente desprezado e a cultura foi tripsinizada (Tripsina-EDTA 1x) e incubada a 37° C, durante 5 minutos. Após esse período, inativou-se a ação da tripsina com acréscimo de meio DMEM completo. A solução foi transportada para um tubo de centrifuga e centrifugada à temperatura de 22° C e 694G (2000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o *pellet* ressuspensionado em meio DMEM completo, e novamente dividido em garrafas de cultura, na proporção 1:2 (cada garrafa formava duas novas garrafas). A cada nova confluência de 80% o procedimento era novamente realizado até atingir a quarta passagem celular.

2.2.1 - Caracterização celular

Uma alíquota das células da quarta passagem, derivadas de tecido adiposo foi caracterizada por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular para CD 73 (anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse – AbCam Cambridge, Massachusetts, EUA), CD 11 (anti-CD11b– AbCam), CD 90 (anti-CD90 clone Ox-7 mouse – AbCam) e CD 45 (anti-CD45 clone 69 mouse – BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA), utilizando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

2.2.2 - Diferenciação osteogênica

Outra alíquota de células de quarta passagem foi submetida a etapas de diferenciação osteogênica. As células aderentes foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas em placa de 6 poços, com lamínulas de 22 mm de

diâmetro, com meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma, St Louis MO, USA), 5,0µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e 10,0mmol/L de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e incubado a 37°C por quatro semanas.

No 30º dia após a colocação das células no meio osteogênico as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas pelo método de Von Kossa para observar a deposição de cálcio.

2.2.3 - Preparo das células para infusão

Após a quarta passagem, outras amostras de células foram tripsinizadas, observadas em microscopia óptica para a avaliação da viabilidade celular, submetidas a contagem em câmara de Neubauer e aliquotadas na concentração de $1,2 \times 10^6$ células/0,5 ml de PBS. Cada alíquota foi armazenada em seringa de 1,0 ml e transportada para o centro cirúrgico, aguardando o momento da infusão.

2.3 - Procedimentos anestésicos

Os coelhos foram mantidos em jejum alimentar de 8 horas. Antecedendo o ato cirúrgico, foram administrados os fármacos pré-anestésicos associando Xilazina (2,5 mg/kg/IM) e Cetamina (25 mg/kg/IM). A veia auricular marginal foi cateterizada para a instituição de fluidoterapia e realização de medicação analgésica com Cloridrato de Tramadol (1,0 mg/kg/IM). Após a perda dos reflexos palpebrais e laringotraqueais, realizou-se a intubação orotraqueal para permitir a manutenção anestésica pela inalação dose efeito de isoflurano. A artéria auricular central foi cateterizada, heparinizada e o cateter conectado a um sistema para mensuração da pressão arterial, para permitir a monitoração anestésica.

O paciente foi posicionado em decúbito dorsal, apoiado sobre calha cirúrgica e realizou-se tricotomia ampla da região abdominal.

2.4 - Procedimento cirúrgico

O campo cirúrgico foi preparado realizando antissepsia com álcool 70% e clorexidine tópico 2% e os panos cirúrgicos foram posicionados. Foi realizada celiotomia mediana pré-retroumbilical, de aproximadamente 6,0 cm, no sentido crânio caudal. O segmento intestinal do jejuno, mais proximal à incisão, foi identificado, exteriorizado da cavidade, identificou-se o ramo da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural e realizou a oclusão utilizando clipe vascular.

O tempo de oclusão foi de duas horas de isquemia e cinco horas de reperfusão. Durante o intervalo de tempo da oclusão, os animais permaneceram anestesiados e tiveram a cavidade abdominal suturada por pontos separados, para evitar perda de fluido abdominal e contaminação. Após a remoção do clipe vascular, a fáscia muscular foi aproximada com pontos tipo Sultan (X), tecido subcutâneo com sutura simples contínua e a pele foi aproximada por sutura intradérmica, utilizando fio não absorvível sintético em todos os planos.

2.5 - Grupos experimentais e tratamentos

Os animais foram numerados dos números 1 ao 24 e foram aleatoriamente distribuídos, por meio de sorteio, nos grupos experimentais contendo doze animais (Tabela 1). A ordem das cirurgias obedeceu à numeração pré-estabelecida.

- Grupo Isquemia duas horas/Reperfusão cinco horas + aplicação intravenosa de solução tampão salina fosfato (I2H/R5H PBS): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 2 horas. Os animais permaneceram anestesiados por duas horas e após esse tempo foi removido o clipe vascular e realizado um ponto com fio de sutura polipropileno não absorvível sintético de cor azul no mesentério próximo ao local da clipagem. Nesse momento considerou o início da reperfusão, a anestesia foi cessada e o paciente permaneceu vivo e acordado. Após o período de 5 horas de reperfusão intestinal foi realizado tratamento com infusão endovenosa de 0,5 mL de PBS, pela veia auricular marginal.

Aos três e sete dias de pós-operatório, seis animais (em cada período) foram submetidos novamente à celiotomia mediana para coleta de fragmentos de intestino para avaliação histológica; swabs peritoneais para teste de translocação bacteriana; após os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica.

- Grupo Isquemia duas horas/Reperusão cinco horas + aplicação intravenosa de células tronco mesenquimais (I2H/R5H CTM): Pacientes submetidos à celiotomia mediana pré-retroumbilical e manipulação do segmento intestinal do jejuno, seguida da realização da oclusão dos vasos durante 2 horas. Os animais permaneceram anestesiados por duas horas e após esse tempo foi removido o clipe vascular e realizado um ponto com fio de sutura polipropileno 5-0 não absorvível sintético de cor azul no mesentério próximo ao local da clipagem. Nesse momento considerou o início da reperusão, a anestesia foi cessada e o paciente permaneceu vivo e acordado. Após o período de 5 horas de reperusão intestinal foi realizado tratamento com infusão endovenosa de células tronco mesenquimais ($1,2 \times 10^6$ células) suspenso em 0,5 mL de PBS, pela veia auricular marginal.

Aos três e sete dias de pós-operatório, seis animais (em cada período) foram submetidos novamente à celiotomia mediana para coleta de fragmentos de intestino para avaliação histológica; swabs peritoneais para teste de translocação bacteriana; após os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica.

Tabela 1: Resumo/delineamento proposto para a confecção dos grupos experimentais.

Grupo	Nº de animais	Tempo Isquemia/Reperusão	Tempo de tratamento	Eutanásia (Momentos/tempo)
I2H/R5H PBS	6	2 horas / 5 horas	Após cinco horas de reperusão	3 dias após tratamento
	6			7 dias após tratamento
I2H/R5H CTM	6	2 horas / 5 horas		3 dias após tratamento
	6			7 dias após tratamento

2.6 - Avaliação macroscópica transcirúrgica

Antes e após a realização da clipagem da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural foi avaliado o aspecto macroscópico do segmento irrigado pelo ramo ocluído e dos segmentos adjacentes, quanto à coloração, peristaltismo (teste de beliscamento) e temperatura ao toque. Os achados macroscópicos foram comparados entre os animais de um mesmo grupo, e entre os grupos.

2.7 - Avaliação de translocação bacteriana (TB)

Para avaliar possível translocação bacteriana, foram realizados swabs peritoneais logo após celiotomia mediana (basal), após a retirada do clipe vascular (isquemia) e durante a realização do segundo procedimento cirúrgico após 3 ou 7 dias pós-tratamento. As culturas foram expressas em unidades formadoras de colônia (UFCs) e foi considerado translocação bacteriana quando houve crescimento nas culturas das amostras de intestino coletado.

2.8 - Exame Histopatológico

Foram coletados três fragmentos intestinais de jejuno através de enterectomia, de aproximadamente 3,0 cm de extensão, sendo um fragmento da região acometida pela lesão isquêmica, um fragmento 10 cm cranial à lesão isquêmica, e outro fragmento 10 cm caudal à lesão isquêmica. Após as coletas, os animais foram submetidos à eutanásia.

Todos os fragmentos extraídos foram fixados em formol 10% e incorporados em parafina. Os tecidos foram seccionados em cortes de aproximadamente 4-5 µm para confecção de lâmina histológica e corada por hematoxilina e eosina.

Foram avaliados histologicamente no mínimo seis campos escolhidos aleatoriamente por lâmina de cada animal e para cada segmento e considerado a mediana de eventos para se classificar estas lesões em escores. O avaliador desconhecia os grupos avaliados.

A classificação histopatológica das lesões intestinais do fragmento isquêmico foi estabelecida de acordo com o escore proposto por Chiu et al. (1970) adaptado demonstrado na tabela 2 e Pagliosa et al. (2009) adaptado, demonstrado nas tabelas 3 e 4. Para avaliar presença de processo inflamatório mononuclear estabeleceu-se um escore proposto na tabela 5. Realizou-se também análise descritiva das lesões encontradas em cada grupo.

Tabela 2: Escore para lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

ESCORE	LESÃO
0	Mucosa sem alteração.
1	Vilosidades preservadas sem lise celular, sem processo inflamatório (PI), com espaço subepitelial (ES).
2	Lise celular, com ES, espaçamento aumentado entre as vilosidades.
3	Desnudamento de vilosidade, com células inflamatórias (CI), capilares dilatados.
4	Destruição estrutural da vilosidade, com CI, necrose e ulceração glandular basal.
5	Destruição total da mucosa.

Chiu et al. (1970) adaptado.

Tabela 3: Escore para edema, hemorragia e presença de polimorfonucleares nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

Escore	EDEMA/ HEMORRAGIA/ PRESENÇA DE POLIMORFONUCLEARES
0	Ausente.
1	Incipiente.
2	Leve.
3	Moderado.
4	Intenso.

Adaptado Pagliosa et al. (2009)

Tabela 4: Escore para dilatação de vasos linfáticos nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

Escore	DILATAÇÃO DE LINFÁTICOS
0	Ausente
1	Moderado
2	Intenso

Adaptado de Pagliosa et al. (2009)

Tabela 5: Escore para processo inflamatório mononuclear nas camadas mucosa e submucosa do jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

ESCORE	PROCESSO INFLAMATÓRIO MONONUCLEAR
0	Ausente
1	Incipiente
2	Leve
3	Moderado
4	Intenso

2.9 - Análise estatística

Para testar a normalidade dos dados histopatológicos classificados em escores foi utilizado teste de Kolmogorov-Smirnov. Após, os dados foram avaliados

usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn, considerado significativo quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPadPrism5®.

3- RESULTADOS

O tecido adiposo propiciou uma cultura heterogênea, composta por células arredondadas, não aderentes e micelas lipídicas no sobrenadante da cultura nas primeiras horas de cultura. Após 24 horas, observou-se células com morfologia fibroblastóides e aderência à garrafa e aos três dias, a população celular apresentava-se mais homogênea, com predominância das células aderentes de morfologia fibroblastóide, organizadas em colônias (Figura 1A e 1B), permanecendo similar durante todos os momentos de observação. A viabilidade celular apresentada pelo teste de Azul de Tripan foi superior a 95,2%.

A caracterização fenotípica obtida pela citometria de fluxo mostrou baixa expressão de marcadores de células hematopoiéticas CD45 (6,17%) e CD11 (3,63%) e alta expressão de marcadores de células tronco CD90 (99,0%) e CD73 (96,7%). Durante a etapa de diferenciação osteogênica, foi observado pontos de calcificação (Figura 1C) da matriz a partir do sétimo dia após indução da diferenciação e as células que se diferenciavam mudaram da aparência fibroblastóide alongada, para uma forma mais arredondada. Evidenciou-se a presença da matriz extracelular rica em cálcio devido à observação de nódulos de mineralização avermelhados na coloração de Von Kossa, ao 30º dia (Figura 1D).

A associação desses dados nos permitiu inferir que o grupo de células utilizado no estudo é de células tronco mesenquimais.

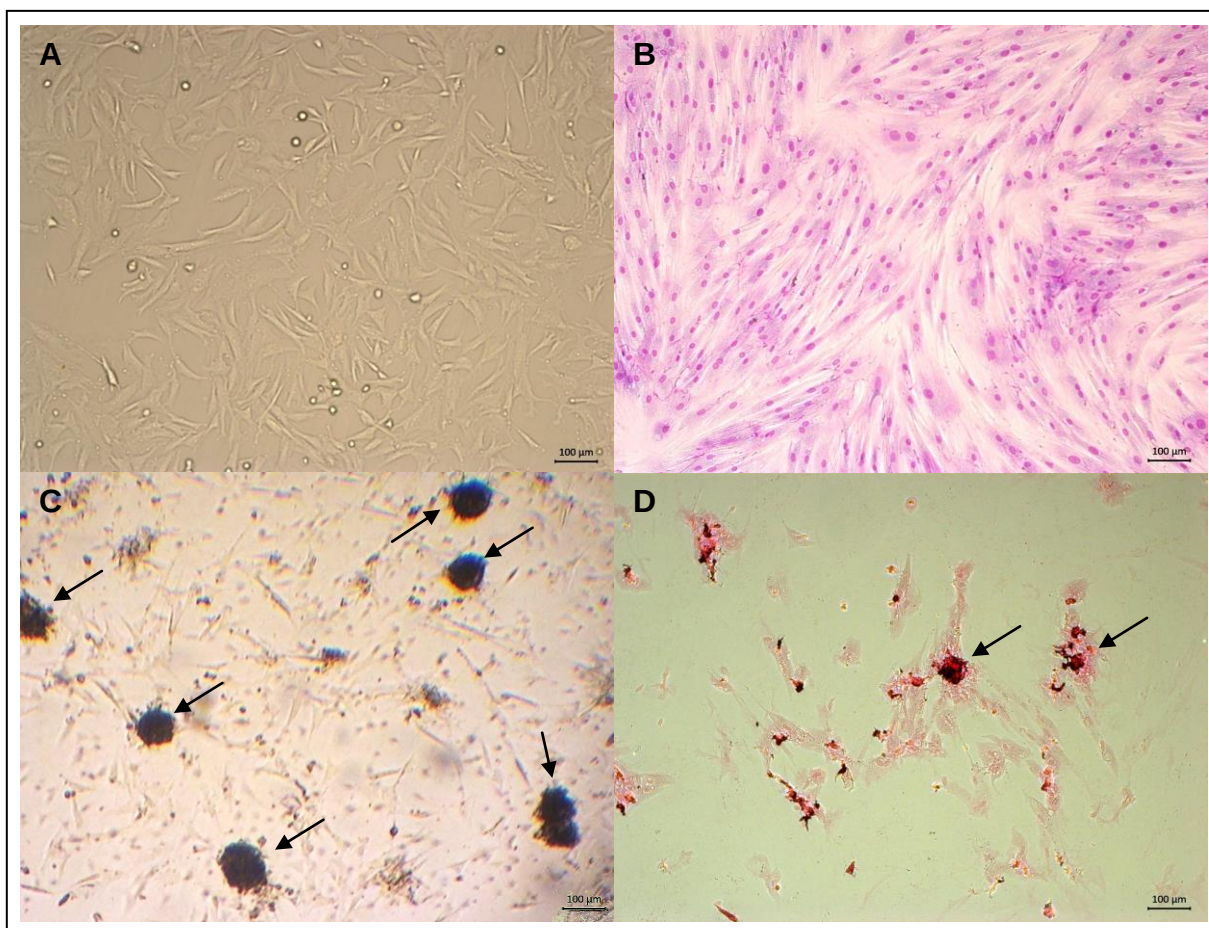


Figura 1: Imagem de microscopia óptica exibindo cultura de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelho. A) Presença de células alongadas, de morfometria fibroblastoide e aderidas em substrato plástico da garrafa, demonstrando confluência celular superior a 80%. B) Cultura de células de quarta passagem, com presença de células alongadas, de morfometria fibroblastoide e aderidas em substrato plástico da garrafa, coradas pela técnica de Giemsa. C) Cultura celular de quarta passagem, submetida à diferenciação osteogênica apresentando pontos de calcificação (seta) da matriz ao sétimo dia após indução da diferenciação. D) Cultura celular de quarta passagem, submetida à diferenciação osteogênica exibindo presença da matriz extracelular rica em cálcio e observação de nódulos de mineralização avermelhados, pela na coloração de Von Kossa, ao 30º dia (escala = 100 µm).

O procedimento de indução anestésica foi realizado de forma a não causar excitação dos animais para que a função hemodinâmica e respiratória mantivesse estável até o momento de realização do procedimento. Em alguns animais não foi possível realizar intubação, portanto estes foram mantidos com auxílio de máscara. Não se observou quaisquer complicações anestésicas.

A clipagem da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural permitiu a oclusão de fluxo sanguíneo para um segmento de aproximadamente 8 cm de extensão, proporcionando após o período de duas horas, alterações de coloração de serosa intestinal, sugerindo congestão, e hipomotilidade. As regiões adjacentes (10 cm cranial e 10 cm caudal) à área irrigada apresentavam-se levemente alteradas. O

tempo médio do procedimento cirúrgico, considerando da incisão de pele até o término da sutura, foi de 2 (duas) horas e 30 (trinta) minutos.

Devido à metodologia aplicada, as alterações macroscópicas relacionadas ao evento de reperfusão não foram avaliadas, uma vez que terminado o período de isquemia, a anestesia era cessada, os animais eram acomodados em gaiolas, observados durante cinco horas, até o momento da realização do tratamento, por infusão endovenosa, permanecendo em observação até três ou sete dias, de acordo com o grupo experimental.

Aos três ou sete dias, os animais foram novamente submetidos à celiotomia mediana. A utilização do fio de sutura polipropileno 5-0 não absorvível sintético para assinalar o local de lesão se demonstrou viável, pois ao submeter os animais novamente à cirurgia, foi possível identificar facilmente o local marcado. Macroscopicamente, observou-se em ambos os grupos I2H/R5HCTM, que a serosa intestinal de todo segmento jejunal apresentava coloração avermelhada intensa e presença de vasos sanguíneos bem evidentes (Figura 2A) e, em resposta ao teste de beliscamento, os segmentos intestinais isquemiados e os segmentos adjacentes ao local de lesão apresentaram resultado positivo.

Nos grupos I2H/R5H PBS 3D e I2H/R5H PBS 7D observou-se aumento de líquido livre em cavidade abdominal, de aspecto seroso e coloração amarelada. Em dois animais do grupo I2H/R5H PBS 7D evidenciou-se a presença de depósito de fibrina em serosa intestinal, e alguns segmentos intestinais aderidos aos outros (Figura 2B). Esta alteração não foi observada nos demais grupos. Também, nos grupos PBS a resposta ao teste de beliscamento dos segmentos intestinais isquemiados e adjacentes foi sugestiva de hipomotilidade.

Não foi constatado crescimento bacteriano nas culturas realizadas a partir do swab peritoneal em todos os momentos de avaliação.

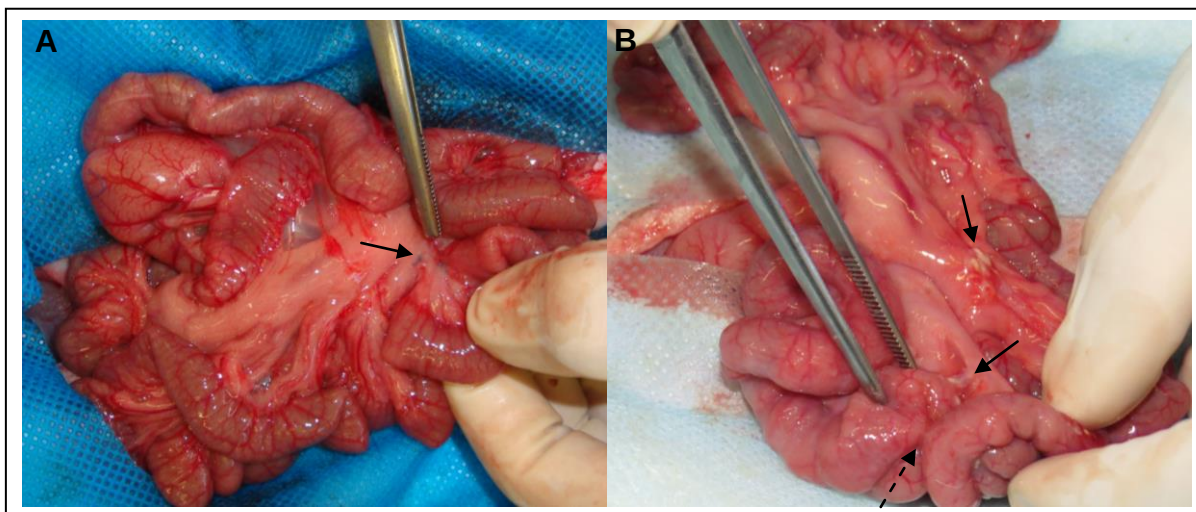


Figura 2: Segmento intestinal de jejuno de animais alocados, submetidos a duas horas de isquemia e cinco horas de reperusão (I2H/R5H). A) Grupo I2H/R5H CTM 7D - serosa intestinal de todo segmento jejunal apresentando coloração avermelhada intensa e presença de vasos sanguíneos bem evidentes. Destaque (seta) para a sutura de mesentério indicando local da oclusão do vaso sanguíneo. B) Grupo I2H/R5H PBS 7D - serosa intestinal de todo segmento jejunal apresentando coloração avermelhada intensa, presença de vasos sanguíneos bem evidentes e presença de depósito de fibrina em serosa intestinal (seta), e alguns segmentos intestinais aderidos aos outros (seta tracejada).

Histologicamente, considerando as lesões em mucosa intestinal, observou-se que nos grupos tratados com PBS evidenciou-se locais de vilosidades com espaço subepitelial (escore 1) e com lises celulares (escore 2) (Figura 3), enquanto nenhuma alteração foi visualizada nos grupos CTM. Os grupos I2H/R5H CTM 3D e I2H/R5H CTM 7D obtiveram diferença significativa em relação aos grupos I2H/R5H PBS 3D e I2H/R5H PBS 7D. As alterações estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Resultados, em escore, das análises histológicas de lesão em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural, segundo Chiu et al. (1970).

COELHOS	ESCORE PARA LESÃO EM MUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	0	0	0	1
2	0	0	2	1
3	0	0	1	2
4	0	0	2	1
5	0	0	1	1
6	0	0	1	2
Mediana	0 ^a	0 ^a	1 ^b	1 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

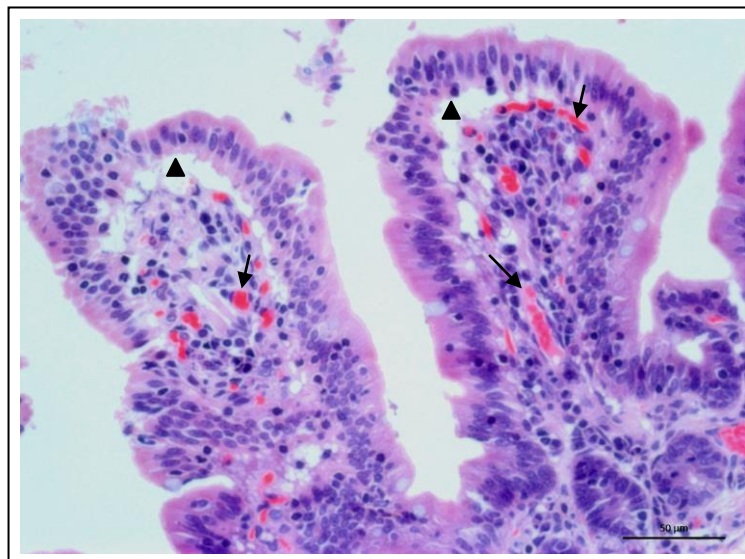


Figura 3: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H PBS 7D exibindo espaço subepitelial (triângulo) em região de mucosa intestinal, classificado com escore 2 e hemorragia incipiente (setas).

Com relação à erosão de mucosa, a maioria das observações constataram ausência de erosão (escore 0), apenas nos grupos tratados com PBS foi possível observar separação entre o epitélio e a lâmina própria na extremidade das vilosidades (escore 1). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Para a variável edema de mucosa avaliado, os grupos I2H/R5H CTM 3D e I2H/R5H CTM 7D apresentaram padrão de classificação ausente/incipiente (escore 0-1), e foram significativamente diferentes do grupo I2H/R5H PBS 3D com $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente, que apresentou graus leve a moderado (Figura 4). Também foi possível observar que esse edema de mucosa tendeu à resolução ao longo dos sete dias de observação.

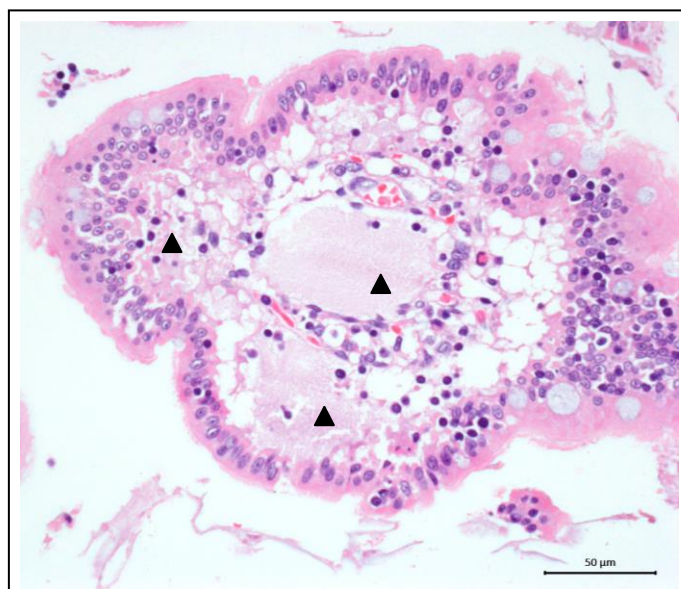


Figura 4: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H PBS 3D exibindo edema de mucosa (triângulo).

Considerando a variável hemorragia em mucosa, a maioria das observações foi classificada em escore 0, isto é, ausentes, com raros achados de hemorragia leve (escore 2). Não observou-se diferença estatística entre os grupos.

Quanto à presença de infiltrado de polimorfonuclear, observou-se mais frequentemente escores leves (escore 2), moderados (escore 3), nos grupos I2H/R5H CTM 3D e I2H/R5H CTM 7D. Houve diferença estatística do grupo I2H/R5H CTM 7D em relação aos grupos I2H/R5H PBS 3D ($p < 0,05$) e I2H/R5H PBS 7D ($p < 0,001$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7: Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PMN em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA PRESENÇA DE PMN EM MUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	2	3	2	0
2	2	3	2	1
3	2	4	1	1
4	2	3	2	0
5	1	3	1	1
6	2	3	1	1
Mediana	2 ^{ab}	3 ^a	1,5 ^b	1 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

A presença de processo inflamatório mononuclear foi observadas nos grupos I2H/R5H CTM 3D e I2H/R5H CTM 7D classificados, principalmente, em escore incipiente (escore 1) e moderado (escore 3) respectivamente. Com base no resultado houve diferença significativa entre dos grupos I2H/R5H CTM 3D em relação ao grupo I2H/R5H CTM 7D ($p < 0,01$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8: Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PIM em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA PRESENÇA DE PIM EM MUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	1	2	1	2
2	2	3	1	2
3	2	3	1	2
4	1	3	3	2
5	1	3	3	2
6	1	3	1	2
Mediana	1 ^a	3 ^b	1 ^{ab}	2 ^{ab}

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Para a variável dilatação de linfático em mucosa, o grupo I2H/R5H CTM 3D apresentou classificação incipiente em sua grande maioria. O grupo I2H/R5H CTM 7D foi classificado como ausente. Ainda os grupos I2H/R5H PBS 3D e I2H/R5H PBS 7D obtiveram classificação incipiente (escore 1) e leve (escore 2) respectivamente. Estatisticamente o grupo I2H/R5H CTM 7D foi diferente dos grupos I2H/R5H PBS 3D ($p < 0,05$) e I2H/R5H PBS 7D ($p < 0,05$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9: Resultados, em escore, das análises histológicas de dilatação de linfático em mucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA DILATAÇÃO LINFÁTICA EM MUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	1	0	1	1
2	1	0	0	1
3	0	0	0	1
4	1	0	2	1
5	1	0	2	1
6	1	0	2	1
Mediana	1 ^{ab}	0 ^a	1,5 ^b	1 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

As observações histopatológicas de submucosa evidenciaram edema presente em graus incipiente (escore 1) a ausentes (escore 0) nos grupos tratados com CTM (Figura 5), diferente do observado nos grupos tratados com PBS, que em sua maioria apresentaram graus moderados (escore 3). A partir destes resultados o grupo I2H/R5H CTM 3D foi significativamente diferente em relação ao grupo I2H/R5H PBS 7D ($p < 0,05$). Também houve diferença entre o grupo I2H/R5H CTM 7D em relação aos grupos I2H/R5H PBS 3D e I2H/R5H PBS 7D ($p < 0,05$; $p < 0,01$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10: Resultados, em escore, das análises histológicas de edema em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA EDEMA EM SUBMUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	1	0	3	3
2	2	0	2	3
3	0	0	2	3
4	1	0	3	3
5	1	1	3	3
6	0	0	3	3
Mediana	1 ^{ac}	0 ^a	3 ^{cb}	3 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

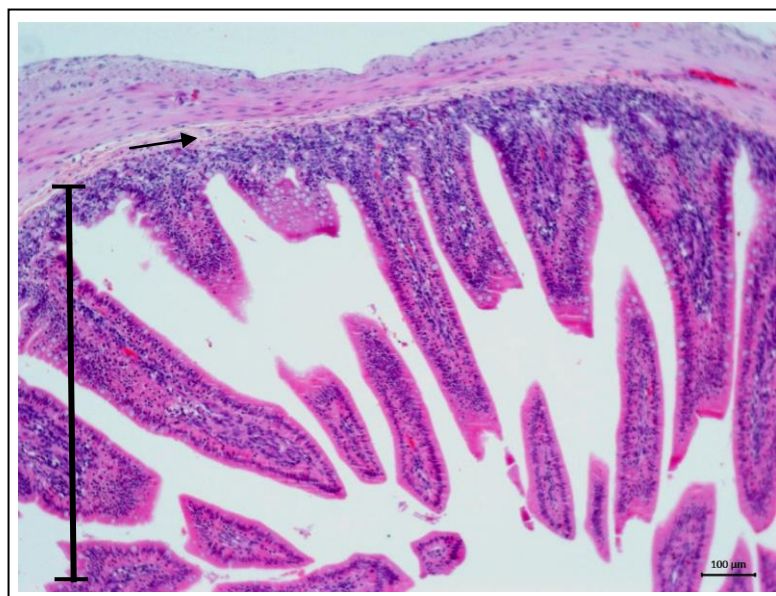


Figura 5: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H CTM 7D exibindo altura de vilosidade preservada (mucosa) (barra) e submucosa (seta) com aspectos histológicos normais.

Não foram visualizados hemorragia em submucosa em nenhum grupo.

A presença de infiltrado polimorfonuclear (PMN) em submucosa foi classificada como moderada (escore 3) nos grupos tratados com CTM, e incipientes (escore 1) nos grupos tratados com PBS. Estatisticamente o grupo I2H/R5H CTM 3D foi significativamente diferente em relação aos grupos I2H/R5H PBS 3D e I2H/R5H PBS 7D ($p < 0,05$; $p < 0,01$). Também o grupo I2H/R5H CTM 7D diferiu significativamente do grupo I2H/R5H PBS 7D. As demais alterações estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11: Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PMN em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA PRESENÇA DE PMN EM SUBMUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	3	2	2	1
2	2	3	1	1
3	3	3	1	1
4	3	3	1	1
5	3	2	2	1
6	2	2	1	1
Mediana	3 ^a	2,5 ^{ac}	1 ^{bc}	1 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Na avaliação de processo inflamatório mononuclear observou-se episódios isolados de presença moderada (escore 3) e leve (escore 2) nos animais do grupo I2H/R5H PBS 7D, contudo, a maior observação foi de presença incipiente (escore 1). Não houve diferença significativa entre os grupos. As demais alterações estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 12: Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de PIM em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampeamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA PRESENÇA DE PIM EM SUBMUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	1	0	0	0
2	1	0	1	3
3	1	0	1	2
4	1	0	2	0
5	1	1	1	1
6	1	0	1	2
Mediana	1	0	1	1,5

Em relação a dilatação de linfático em submucosa também evidenciou-se que o grupo I2H/R5H CTM 7D obteve classificação ausente (escore 0) na grande maioria dos animais avaliados. Com base nos resultados, o grupo I2H/R5H CTM 7D foi significativamente diferente dos grupos I2H/R5H PBS 3D e I2H/R5H PBS 7D ($p < 0,05$; $p < 0,05$). As demais alterações estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13: Resultados, em escore, das análises histológicas de presença de dilatação linfática em submucosa de jejuno de coelhos Nova Zelândia submetidos à isquemia e reperfusão por clampamento da artéria/veia marginal peri-intestinal extramural.

COELHOS	ESCORE PARA DILATAÇÃO LINFÁTICA EM SUBMUCOSA			
	I2H/R5H CTM 3D	I2H/R5H CTM 7D	I2H/R5H PBS 3D	I2H/R5H PBS 7D
1	1	0	0	0
2	1	0	1	3
3	1	0	1	2
4	1	0	2	0
5	1	1	1	1
6	1	0	1	2
Mediana	1 ^{ab}	0 ^a	1 ^b	1,5 ^b

Na mesma linha, letras iguais representam equivalência estatística e letras diferentes representam diferença entre os grupos.

Nos grupos tratados com CTM também foram observadas elevada presença de células mitóticas em região de criptas e interstício (Figura 6) e a diminuição discreta da densidade e encurtamento de vilosidades. Contudo, essas rarefações de vilosidades também estavam intensamente presentes nos grupos tratados com PBS.

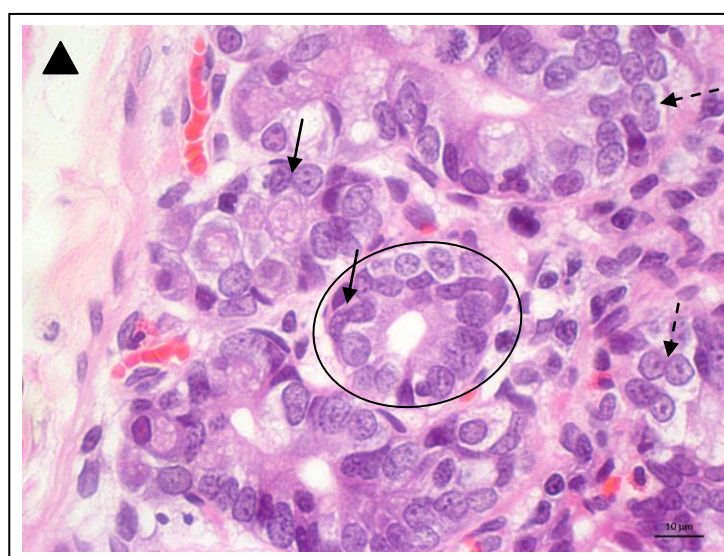


Figura 6: Fotomicrografia de animal alocado no grupo I2H/R5H CTM 7D exibindo mitose de células em região de criptas (setas) e em interstício (setas tracejadas) em mucosa intestinal (círculo) (triângulo = submucosa intestinal).

4- DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram os efeitos benéficos da terapia de células tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo (ADCTM) na reparação tecidual das lesões medulares (BARRIGA et al., 2013), infarto do miocárdio (NAAIJKENS et al., 2014), doenças neurológicas (BAE et al., 2007), lesões renais (CHEN et al., 2014) entre outros. No entanto, estudos propondo terapias de distúrbios intestinais utilizando ADCTM ainda estão escassos, encorajando o presente estudo.

Os grupos tratados com ADCTM obtiveram menores escores de lesão de mucosa e submucosa, pela avaliação histológica, em relação aos grupos tratados com PBS. A aceleração na recuperação funcional e estrutural do intestino após a lesão pode ser explicado pelo potencial das ADCTM de se diferenciar em fenótipos das células de tecidos danificados, aumento na angiogênese do órgão lesionado (CAPLAN, 2009) e produção de fatores de crescimento e citocinas que culminaram no aumento da reparação tecidual no local de lesão (MAJUMDAR et al., 1998). Resultados benéficos utilizando terapia de CTM derivadas de medula óssea também foram evidenciadas por Jiang et al. (2011) em um estudo sobre I/R intestinal em ratos.

Apenas nos grupos tratados com PBS observou-se poucos eventos hemorrágicos em mucosa e submucosa, divergindo das constatações de Pagliosa et al. (2009) que observaram que, no grupo no qual foi realizada a oclusão venosa para causar a lesão de I/R em jejuno de equinos, houve marcante presença de hemorragia e edema em mucosa e submucosa. Essas alterações explicam-se em decorrência da hipóxia seguida de perfusão que acarretará lesões no endotélio vascular, perda de permeabilidade e extravasamento de hemácias e ação das espécies reativas de oxigênio (RLO) (DEBAREINER et al., 2001).

Aos três dias de observação, tanto edema quanto dilatação de linfáticos nos grupos tratados com CTM estavam menos evidentes que nos grupos tratados com PBS. Estes resultados sugerem que as moléculas solúveis liberadas pelas células troncam no momento de contato com um tecido lesionado disparam uma série de eventos celulares benéficos em prol da reparação tecidual, capazes de minimizarem as lesões vasculares, regulando a pressão hidrostática capilar e abreviando a

formação de edema (NAUTA & FIBBE, 2007; JIANG et al. 2011; MONTEIRO et al. 2012).

Ademais, o potencial de modulação da resposta inflamatória provocado pelas CTM pode estar diretamente envolvido nos baixos escores de edema, dilatação de linfático e hemorragia, uma vez que a interação destas células sobre as células apresentadoras de antígenos e sobre os linfócitos T, atenuando e direcionando o processo inflamatório no sítio de lesão (NAUTA & FIBBE, 2007; WAN et al., 2008), processo esse que, quando fisiológico, é fundamental para iniciar as etapas de reparação do organismo (TAKASHI et al., 2007; MONTEIRO et al., 2010).

A presença moderada de polimorfonucleares no sítio de lesão dos animais tratados com ADCTM comparada com a ausência nos grupos PBS também demonstra a capacidade destas células mesenquimais em promover a quimiotaxia para o leito lesional, promovendo imunomodulação e intensificando a reparação tecidual (CAPLAN, 2009).

Com o avançar do período de observação, ou seja, aos sete dias, independente do grupo experimental, houve uma tendência do organismo em reparar as lesões provocadas pela isquemia e reperfusão, como, por exemplo, a diminuição de edema de mucosa evidenciada no grupo PBS 7D comparando-o com o grupo PBS 3D. Essa observação reforça que quando a lesão provocada no organismo não é severa, as células residentes são capazes de assumir o processo de reparação e que a aplicação de células tronco potencializam e antecipam as etapas e diminuem a morbidade dos pacientes (MONTEIRO et al., 2012).

A quantidade de células em atividade mitóticas presentes em região de cripta e interstício que foi observada de forma intensa nos grupos tratados com ADCTM, e de forma incipiente nos grupos tratados com PBS, pode ser explicada pelo fato de as CTM estimularem a mitose celular na região de lesão de células progenitoras do tecido intrínseco (CAPLAN, 2009). Na região de cripta intestinal existe uma população de células tronco intestinais residentes (CTI) responsáveis pela alta taxa de produção celular em diferentes situações. As CTI são capazes de se diferenciar em diferentes células da constituição estrutural do intestino, e em situações de injúria, irão responder promovendo mitoses celulares na tentativa de reparar o tecido (BARKER et al., 2008; CHEN et al., 2014).

5- CONCLUSÃO

O estabelecimento de cultura celular de coelhos foi considerado de fácil realização, obtendo culturas confluentes e homogêneas atendendo aos critérios de classificação para que estas sejam consideradas tronco. O modelo experimental usado provocou lesões em mucosa e submucosa intestinais. A infusão de células tronco atenuou as lesões provocada pela I/R intestinal em ambos os grupos CTM quando comparado ao grupo tratado com PBS. O tratamento com ADCTM para as lesões de I/R intestinais pode ser utilizado nas demais espécies domésticas, porém se faz necessário a realização de mais estudos a respeito de seu efeito benéfico para este tipo de lesão.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEEN, S.M.; MATHEW, T.C.; DASHTI, H.M.; ASFAR, S. Protective effects of green tea on intestinal ischemia-reperfusion injury. **Journal Nutrition**, v. 27, p. 598-603, 2011.
- ALVES, G. E. S. et al. Hydrocortisone decreases apoptosis in jejunum of horses subjected to experimental ischemia and reperfusion. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 471-476, 2011.
- AVGERINOS, E. D.; KOSTOPANAGIOTOU, G.; COSTOPANAGIOTOU, C.; KOPANAKIS, N.; ANDREADOU, I.; LEKKA, M.; NAKOS, G.; SMYIRNIOTIS, V. Intestinal preconditioning ameliorates ischemia-reperfusion induced acute lung injury in rats: an experimental study. **Journal of Surgical Research**, v. 160, p. 294-301, 2010.
- BAE, J. S.; HAN, H. S.; YOUN, D. H.; CARTER, J. E.; MODO, M.; SCHUCHMAN, E. H; JIN, H. K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. **Stem Cells**. v. 25, p. 1307-1316, 2007.
- BARKER, N.; VAN DE WATERING, M.; CLEVERS, H. The intestinal stem cell. **Genes Development**, v. 22, p. 1856, 2008.
- BARRIGA, A.; MEDRANO, M.; DE JUAN, J.; BURGOS, J. Intravenous infusion of adult adipose tissue stem cells for repairing spinal cord ischaemic lesions. An experimental study on animals. **Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología**, v. 57, p. 89-94, 2013.
- BEN, D. F.; YU, X. Y.; JI, G. Y.; ZHENG, D. Y.; LV, K. Y.; MA, B.; XIA, Z. F. TLR4 mediates lung injury and inflammation in intestinal ischemia-reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 174, p. 326-333, 2012.
- BOYBEYI, O.; GUNAL, Y. D.; ATASOY, P.; KISA, U.; ASLAN, M. K. The effect of colchicine and low-dose methotrexate on intestinal ischemia/ reperfusion injury in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, 2014. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.01.057.
- CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 318-324, 2009.
- CHEN, Y.; LEE, S.; TSAI, Y.; TSENG, S. Ischemic preconditioning increased the intestinal stem cell activities in the intestinal crypts in mice. **Journal of Surgical Research**, v. 187, p. 85-93, 2014.
- DABAREINER, R. M.; SULLINS, K. E.; WHITE, N. A.; Snyder, J. R. Serosal injury in the equine jejunum and ascending colon after ischemiareperfusion or intraluminal distention and decompression. **Veterinary Surgery**, v. 30, p. 114-125, 2001.
- DABAREINER, R.M.; WHITE, N.A.; SNYDER, J.R.; FELDMAN, B. F.; DONALDSON, L. L. 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. **American of Journal Veterinary. Research**, v. 66, p. 525-536, 2005.
- GAO, C. J.; CHAI, W.; XU, L.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; HAN, L.; SUN, X. Protective effects of hyperoxygenated solution preconditioning on intestinal ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Journal of Surgical Research**. v. 135, p. 268-274, 2006.
- GIORDANO, A.; GALDERISI U.;MARINO I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, p. 27-35, 2007.
- GRECA, F. H.; GONÇALVES, N. M. F. M.; SOUZA FILHO, Z. A.; NORONHA, L.; SILVA, R. F. K. C.; MICHEL, R. R. The protective effect of methylene blue in lungs, small bowel and kidney after intestinal ischemia and reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, p. 149-156, 2008.

- HUNG, W. T.; CHEN, Y.; TSENG, S. H.; LI, H. L.; CHEN, C. K. Fetal bovine serum suppresses apoptosis in the small intestine after total ischemia and reperfusion in mice. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 39, p. 1077-1083, 2004.
- ITAGAKI, S.; OIKAWA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. Protective effects of quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. **Food Chemistry**, v. 118, p. 426-429, 2010.
- JIANG, H.; QU, L.; LI, Y.; GU, L.; SHI, Y.; ZHANG, J.; ZHU, W.; LI, J. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce intestinal ischemia/reperfusion injuries in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 168, p. 127-134, 2011.
- KASZAKI J, WOLFÁRD A, SZALAY L, BOROS M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. **Transplant Proceedings**, v. 38, p. 826–828, 2006.
- KOSTOPANAGIOTOU, G.; AVGERINOS, E.; COSTOPANAIOTOU, C.; ARKADOPOULOS, N.; ANDREADOU, I.; DIAMANTOUPPOULOU, K.; LEKKA, M.; SMYRNIOTIS, V.; NAKOS, G. Acute lung injury in a rat model of intestinal Ischemia-Reperfusion: the potential time depended role of phospholipases A2. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 108-116, 2007.
- KUBIAK, B. D.; ALBERT, S. P.; GATTO, L. A. SNYDER, K. P.; MAIER, K. G.; VIEAU, C. J.; ROY, S.; NIEMAN, G. F. Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. **Shock**, v. 34, p. 525-534, 2010.
- MA, L.; WANG, G.; CHEN, Z.; LI, Z.; YAO, J.; ZHAO, H.; WANG, S.; MA, Z.; CHANG, H.; TIAN, X. Modulating the p66shc signaling pathway with protocatechuic acid protects the intestine from ischemia-reperfusion injury and alleviates secondary liver damage. **The Scientific World Journal**, v. 16, p. 1-11, 2014.
- MAJUMDAR, M. K.; THIEDE, M. A.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M.; GERSON, S. L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, p. 57, 1998.
- MANIERI, N. A.; STAPPENBECK, T. S. Mesenchymal stem cell therapy of intestinal disease: are their effects systemic or localized? **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, p. 119–124, 2011.
- MONTEIRO, B. S.; ARGOLO-NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, p. 95-100, 2008.
- MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, p. 238-245, 2010.
- MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; NARDI, N. B.; CHAGASTELLES, P. C.; CARVALHO, P. H.; BONFÁ, L. P.; DEL CARLO, R. J. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 84, p. 841-851, 2012.
- MEIRELLES, L. S; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 26, p. 2287-2299, 2008.
- NAAIJKENS, B. A.; VAN DIJK, A.; KAMP, O.; KRIJNEM, P. A. J.; NIESSEN, H. W. M.; JUFFERMANS, L. J. M. Therapeutic Application of Adipose Derived Stem Cells in Acute Myocardial Infarction: Lessons from Animal Models. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, p. 389-398, 2014.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.
- OLDENBURG, W. A.; LAU, L. L.; RODENBERG, T. J. et al. Acute mesenteric ischemia: A clinical review. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 1054-1062, 2004.

- PAGLIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S.; FALEIROS, R. R.; MATOS, J. R. T.; TORRES, M. B.; MENDES, H. M. F.; COSTA, R. S. Utilização da glutamina no tratamento de lesões de isquemia e reperfusão no jejuno em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 246-252, 2009.
- PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979-1987, 2004.
- PITTENGER, M. F.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.
- RITZ, J. P.; GERMER, C. T.; BUHR, H. J. Prognostic factors for mesenteric infarction: multivariate analysis of 187 patients with regard to patient age. **Annals of Vascular Surgery**, v.19, p.328-34, 2005.
- ROCHA, B. C.; MENDES, R. R. S.; LIMA, G. V.; ALBUQUERQUE, G. Z.; ARAÚJO, L. L.; JESUS, M. N. S.; SANTOS, W. L. C.; CARREIRO, M. C. Modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal porclameamento de aorta abdominal em ratos Wistar. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 39, p. 207-210, 2012.
- ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clin. Techniques in Equine Practice**, v. 1, p. 148-162, 2002.
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 861-872, 2007.
- VASILEIOU, I.; KALIMERIS, K.; NOMIKOS, T.; XANTHOPOULOU, M.N.; PERREA, D.; AGROGIANNIS, G.; NAKOS, G.; KOSTOPANAGIOTOU, G. Propofol Prevents Lung Injury Following Intestinal Ischemia-Reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 172, p. 146-152, 2012.
- VOLLMAR, B.; MENDER, M.D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, p. 13-29, 2011.
- WAN, C. D.; CHENG, R.; WANG, H. B.; LIU, T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 7, p. 29-33, 2007.
- YASUHARA, H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. **Surgery Today**, v.35, p. 185-195, 2005.
- YURDAKAN, G.; TEKIN, I. O.; COMERT, M.; ACIKGOZ, S.; SIPAHI, E. Y. The presence of oxidized low-density lipoprotein and inducible nitric oxide synthase expression in renal damage after intestinal ischemia reperfusion. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 28, p. 16-22, 2012.