

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**LESÕES DE ISQUEMIA ARTERIOVENOSA E REPERFUSÃO EM
JEJUNO DE EQUINOS: IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE
JUNÇÃO E HISTOPATOLOGIA**

Aline Machado Rapello do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

GOIÂNIA

2007

ALINE MACHADO RAPELLO DO NASCIMENTO

**LESÕES DE ISQUEMIA ARTERIOVENOSA E REPERFUSÃO EM
JEJUNO DE EQUINOS: IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE
JUNÇÃO E HISTOPATOLOGIA**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof^o. Dr. Luiz Augusto Batista Brito – EV/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo – EV/UFG

GOIÂNIA

2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

N244I Nascimento, Aline Machado Rapello do.
Lesões de isquemia arteriovenosa e reperfusão em jejuno de eqüinos [manuscrito]:imunoistoquímica de proteínas de junção e histopatologia / Aline MachadoRapello do Nascimento.Goiânia, 2007.
xiii, 89 f. : il. ; figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito; Co-orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2007.

Bibliografia: f 84-89.
Inclui listas de figuras, quadros e tabelas.

1. Eqüino – Patologia molecular, 2. Isquemia e reperfusão, 3. Histopatologia, 4. Beta-catenina, 5. Ocludina I. Brito, Luiz Augusto Batista. II. Araújo, Eugênio Gonçalves de. III. Universidade Federal de Goiás, **Escola de Veterinária**. V. Título.

CDU: 619:636.1

ALINE MACHADO RAPELLO DO NASCIMENTO

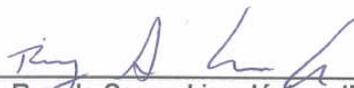
Dissertação defendida e aprovada em **31/12/2007**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti



Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior - IPTSP/UFG

Dedico este trabalho ao meu filho
Lucca

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo amor incondicional, pela constante lâmpada sobre meus pés e luz para os meus caminhos sem as quais nunca poderia caminhar;

Aos meus pais Ronaldo Rapello e Eliana Rapello pelo amor e suporte fundamentais e pelos exemplos de vida e de dedicação na área acadêmica;

Ao meu filho Lucca Rapello pela inspiração e motivação na busca pessoal e profissional pela sabedoria;

Ao meu irmão Marcio Rapello e cunhada Gabriela Ortiz de Rozas pelas conversas e momentos de descontração;

Ao Gregoire Saint Gal de Pons pelo carinho, pela atenção e paciência nos momentos difíceis;

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, por viabilizar a realização deste trabalho;

Ao meu orientador Luiz Augusto Batista Brito pela serenidade e prontidão na ajuda em todos os aspectos científicos do presente trabalho e acadêmicos do curso de mestrado;

Ao meu co-orientador Êugênio Gonçalves de Araújo pelas elucidações das dúvidas e confiança;

À amiga e colega Liliana Borges de Menezes pela dedicação, paciência e conhecimentos compartilhados;

À amiga e colega Leila pela disponibilidade na elucidação de dúvidas e pela amizade sincera;

À colega Luciana Ramos Gaston Brandstetter e à Universidade Paulista – UNIP pela aceitação e oportunidade de realização dos experimentos;

Aos amigos e colegas Marina, Adilson, Tatiana e Júlia pela prontidão de ajuda;

Ao amigo e colega Professor Álvaro Luiz Marinho Castro e às Faculdades Integradas da Terra de Brasília – FTB, pela compreensão, suporte e apoio constantes;

Ao amigo e colega Professor Rafael Mondadori e à União Pioneira de Integração Social – UPIS, pelo apoio e por ceder as instalações institucionais para realização da etapa histopatológica deste trabalho;

Ao funcionário e colega Renato, do Setor de Patologia da UPIS, pela

assistência técnica prestada e profissionalismo;

À amiga e colega Professora Dra. Rita de Cássia pelo material bibliográfico concedido;

Aos amigos e colegas da turma do mestrado, do trabalho e amigos pessoais que não tiveram seus nomes descritos por serem muitos, porém sempre presentes e importantes durante esta etapa da minha vida pela amizade sincera e apoio;

Ao centro de Zoonoses de Goiânia, por conceder os animais utilizados nos experimentos;

Aos eqüinos que participaram deste estudo perdendo suas próprias vidas, porém que estarão por muito tempo sendo lembrados e estudados por inúmeros alunos da medicina veterinária, mediante as lâminas histopatológicas e de Imunoistoquímica utilizadas no experimento, em aulas de histologia e histopatologia veterinária, permitindo o conhecimento futuro para a cura das enfermidades gastrointestinais que acometem sua espécie.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Histofisiopatogênese do intestino delgado dos Eqüinos	03
2.2 Isquemia e reperfusão	05
2.3 Junções Intercelulares	17
3 OBJETIVOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Animais	30
4.2 Tratamentos e delineamento experimental das amostras	31
4.3 Procedimentos Cirúrgicos	31
4.4 Modelo experimental	33
4.5 Biópsias	35
4.6 Morfologia qualitativa	35
4.7 Imunoistiquímica	36
4.8 Análise estatística	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Aspectos microscópicos qualitativos pela coloração Hematoxilina e Eosina.....	40
5.2 Avaliações das expressões das proteínas β -catenina e ocludina.....	54
5.3 Relevância clínica.....	81
6 CONCLUSÃO	84
REFERENCIAS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeitos gerais da hipóxia sobre a célula. A linha tracejada separa as alterações reversíveis das irreversíveis.....	09
Figura 2	Mecanismos propostos da injúria por isquemia e reperfusão intestinal.....	17
Figura 3	Domínio extracelular da caderina.....	20
Figura 4	Representação esquemática das proteínas transmembrânicas das JO, Ocludina e Claudina.....	27
Figura 5	Fotomicrografia de intestino delgado de equino evidenciando progressão do edema nos períodos de isquemia e reperfusão. (A) Aspecto normal de túnica mucosa intestinal e suas lâminas epitelial (LE), própria (LP) e muscular da mucosa (MM). Abaixo Túnica submucosa (SM). Animal D1. (H&E Aumento de 25x). (B) Lâmina própria apresentando vasos congestionados (seta) e edema que leva ao leve aumento do volume da lâmina própria (asterisco). Observar edema na Túnica Submucosa (SM). Tempo 2. Animal D. (H&E 25x). (C) Edema da Lâmina própria (LP), moderado afastamento entre criptas e diminuição do comprimento das mesmas. Abaixo Muscular da mucosa (Mm) e Submucosa (SM) também apresentando edema moderado. Animal D4. (H&E 25x).(D) Edema da lâmina própria (LP) evidenciando aumento do diâmetro de vaso lacteal (VL) em vilosidade intestinal, afastamento entre criptas e acentuado edema na submucosa (SM). Animal (D5). (H&E 25X).....	53
Figura 6	Fotomicrografias representativas da marcação com anticorpo anti- β -catenina em cortes de intestino delgado de equinos submetidos à isquemia e reperfusão. (A) Forte expressão da proteína β -catenina no epitélio das vilosidades e criptas jejunais no Tempo 1. Animal B1 (Aumento de 100 x). (B) Fraca expressão da proteína β -catenina no epitélio das vilosidades e criptas jejunais no Tempo 5. Animal B5. (Aumento de 40x).....	55
Figura 7	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal A nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	58

Figura 8	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal B nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	59
Figura 9	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal C nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	60
Figura 10	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal D nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	62
Figura 11	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal E nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	64
Figura 12	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal F nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	65
Figura 13	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal G nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	67
Figura 14	Fotomicrografias representativas da marcação com anticorpo anti- ocludina em cortes de intestino delgado de eqüinos submetidos á isquemia e reperfusão. (A) Forte expressão da proteína ocludina no epitélio das vilosidades (VL), microvilosidades e criptas jejunais (CP) no Tempo 1. Animal B1 (Aumento de 40 x). (B) Fraca expressão da proteína ocludina no epitélio das vilosidades, microvilosidades (VL) e criptas jejunais (CP) no Tempo 5. Animal B5. (Aumento de 40x).....	69
Figura 15	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal A nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	72

Figura 16	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal B nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	72
Figura 17	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal C nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	73
Figura 18	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal D nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	75
Figura 19	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal E nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	76
Figura 20	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal F nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	78
Figura 21	Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal G nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Escores aplicados as diversas alterações na mucosa jejunal..	35
Quadro 2	Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo ao controle	42
Quadro 3	Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo de isquemia arteriovenosa completa de cinco minutos	42
Quadro 4	Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a cinco minutos de reperfusão completa	43
Quadro 5	Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a 60 minutos de reperfusão completa	44
Quadro 6	Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a 120 minutos de reperfusão completa	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal A (n=08) nos tempos de 1 a 5	56
Tabela 2	Médias dos valores absolutos (n=8) individuais obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para os Animais de A a G nos tempos de 1 a 5	56
Tabela 3	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal B (n=08) nos tempos de 1 a 5	57
Tabela 4	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal C (n=08) nos tempos de 1 a 5	59
Tabela 5	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal D (n=08) nos tempos de 1 a 5	61
Tabela 6	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal E (n=08) nos tempos de 1 a 5	63
Tabela 7	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal F (n=08) nos tempos de 1 a 5	64
Tabela 8	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal G (n=08) nos tempos de 1 a 5	66
Tabela 9	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal A (n=08) nos tempos de 1 a 5	70
Tabela 10	Médias dos valores absolutos (n=8) individuais obtidos da avaliação morfocolorimétrica para determinação da expressão imunoistoquímica da Ocludina para os Animais de A a G nos tempos de 1 a 5	70

Tabela 11	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal B (n=08) nos tempos de 1 a 5	71
Tabela 12	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal C (n=08) nos tempos de 1 a 5	73
Tabela 13	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal D (n=08) nos tempos de 1 a 5	74
Tabela 14	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal E (n=08) nos tempos de 1 a 5	76
Tabela 15	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal F (n=08) nos tempos de 1 a 5	78
Tabela 16	Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal G (n=08) nos tempos de 1 a 5	79

RESUMO

Realizou-se o estudo da patogenia da lesão por isquemia arteriovenosa completa dos vasos mesentéricos e reperfusão jejunal em eqüinos por meio da avaliação da expressão das proteínas β -catenina e ocludina presentes neste epitélio, em sete eqüinos, sem raça definida. Os animais foram submetidos á celiotomia asséptica na linha alba e coleta de cinco segmentos jejunais correspondentes á um segmento controle, um segmento tratado com isquemia por cinco minutos, e três segmentos coletados durante o período de reperfusão tecidual aos cinco, sessenta e cento e vinte minutos, respectivamente. As lesões induzidas experimentalmente por oclusão arteriovenosa total seguida por reperfusão foram similares às lesões adquiridas naturalmente tanto no período de isquemia quanto no agravamento das lesões observado nos tempos de reperfusão. As mudanças que ocorrem quando um intestino isquêmico sofre reperfusão são progressivas e incluem edema de mucosa, submucosa e serosa, infiltração polimorfonuclear e mononuclear e alterações nos padrões vasculares. A análise imunoistoquímica revelou forte expressão da β -catenina em todos os animais e a sua progressiva perda da expressão quando submetidos à isquemia e reperfusão. Isso indica perda progressiva da adesividade intercelular. Resultados similares de redução do total da expressão da Ocludina, uma proteína de junção de oclusão, foram observados. Esta proteína está envolvida na regulação dos movimentos dos solutos na via paracelular e também desempenha um importante papel na manutenção da polaridade celular. A diminuição da expressão de ambas as proteínas intercelulares demonstra a lesão à β -catenina devido à progressão do edema durante isquemia e o agravamento durante a reperfusão tecidual e também mostra um aumento na permeabilidade da via paracelular e suas conseqüências relacionadas à degradação da Ocludina.

Palavras-chaves: Beta-catenina, Junção de aderência, Junção de Oclusão, ocludina.

ABSTRACT

To evaluate whether complete arteriovenous ischemia followed by reperfusion of mesenteric blood flow aggravates lesions involving small intestine of horses, β -catenin and occludin expressions were measured in jejune epithelia of seven equines, without definite breed. The animals had been submitted to aseptic ventral midline celiotomy and five jejune segments collected corresponding to a baseline segment, a five minutes segment subjected to ischemia, and three segments collected after being subjected to five, sixty and one hundred and twenty minutes of tecdual reperfusion, respectively. Experimentally induced lesions created by total arteriovenous occlusion followed by reperfusion were similar to naturally acquired lesions, as much in the period of ischemia as in the aggravation of the injuries observed during reperfusion. Changes that occur when ischemic intestine is reperfused are progressive, and include mucosal, submucosal, and serosal edema; polymorphonuclear and mononuclear cell infiltrates; and alterations in vascular patterns. Immunohistochemistry analyses have shown strong staining baseline segments for β -catenin in all animals and its progressive lack of staining during ischemia and reperfusion treatments. That indicates progressive lack of intercellular adherence. Similar results of specific decreases of total expression of Occludin, a tight junction protein, were observed. This protein is involved in regulating the movement of solutes in the paracellular pathway and also plays an important role in the maintenance of cell polarity. The reduction of expressions of both intercellular proteins measured directly demonstrates β -catenin injury due to progression of edema during ischemia and its aggravation during reperfusion and also shows an increase of the permeability of paracelular pathways and its related consequences to degradation of Ocludina.

Key-words: Beta-catenin, Adherents Junction, Junction of Occlusion, occludin.

1. INTRODUÇÃO

A manutenção de níveis adequados de fluxo sanguíneo e da perfusão tecidual são necessários para o aporte de oxigênio e nutrientes para as células, preservando os padrões metabólicos celulares e removendo os produtos residuais do metabolismo celular. A isquemia ocorre quando o fluxo sanguíneo é diminuído tanto por uma constrição funcional como por uma obstrução mecânica da vasculatura. A severidade da injúria tecidual isquêmica é determinada pela magnitude e duração do fluxo sanguíneo diminuído. A maioria dos tecidos pode suportar um decréscimo substancial no fluxo sanguíneo devido a suas reservas celulares de energia e as suas habilidades de aumentar a extração do oxigênio. Se os índices metabólicos aumentarem ou se o fluxo sanguíneo for reduzido aquém do necessário para a manutenção da viabilidade celular serão inevitáveis mudanças estruturais e funcionais. A restauração do fluxo sanguíneo e do suprimento de oxigênio em tecidos isquêmicos é necessária para o restabelecimento das funções normais e reparação dos componentes danificados (MOORE et al., 1995)

Estudos retrospectivos revelaram que lesões isquêmicas são observadas em mais da metade dos casos de cólica eqüina que requerem tratamento cirúrgico e que estes casos estão associados aos piores prognósticos. Além disso, as lesões intestinais decorrentes da isquemia são importantes por vários outros fatores como a diversidade de sua etiologia, a complexidade de sua fisiopatologia, o comprometimento sistêmico e as seqüelas e complicações que determinam (FALEIROS, 2000).

Outro aspecto de grande relevância, frente a uma lesão devido à isquemia, é o fato de que seus efeitos deletérios podem ser agravados mesmo após a restauração da irrigação normal, caracterizando uma lesão que vem sendo denominada como injúria de reperfusão. Alguns autores consideram que as lesões celulares, observadas durante o processo de reperfusão, podem ser mais graves do que as próprias lesões causadas pela isquemia. A injúria de reperfusão já foi observada em vários órgãos e tecidos de várias espécies e existe uma grande variação na suscetibilidade a essa lesão entre espécies, órgãos e tecidos de um mesmo indivíduo. Na medicina veterinária, as pesquisas sobre isquemia e

reperfusão têm sido concentradas na área de gastroenterologia eqüina, na qual distúrbios acompanhados de isquemia são importantes pela elevada ocorrência. No trato gastrointestinal de eqüinos, o agravamento das lesões após reperfusão já foi verificado no jejuno, no cólon maior e cólon menor. Existem muitos aspectos anatômicos peculiares dos eqüinos que servem como fatores predisponentes e desencadeantes do abdome agudo. No intestino delgado, o mesentério muito desenvolvido facilita as ectopias e volvos (GOLOUBEFF, 1993; FALEIROS, 2000; RIO TINTO et al., 2004).

A função de barreira é uma tarefa essencial de todo epitélio, dependendo tanto da integridade quanto da contribuição de muitas proteínas de membrana e do citoesqueleto que compreendem e regulam os complexos juncionais existentes entre as células. A integridade da barreira epitelial intestinal depende de um complexo de proteínas que compõe diferentes junções intercelulares, incluindo as junções de oclusão (JO), junções de aderência (JA) e desmossomos. (ARAÚJO, 2001; XIN GUO et al., 2003; MUSCH et al., 2005; WARY, 2005).

O comprometimento das funções da barreira epitelial é comum tanto em mucosas inflamadas aguda ou cronicamente. Estas mudanças são em parte devidas á deficiências específicas na regulação de proteínas chaves de junção intercelular por citocinas inflamatórias. Contudo, no contexto da inflamação aguda da mucosa os mecanismos que delimitam a diminuição das funções da barreira são menos bem definidos (MUSCH et al., 2005).

Apesar dos recentes avanços terapêuticos e clínicos, a taxa de óbito em eqüinos portadores de enfermidades estrangulantes ainda é elevada, uma vez que a isquemia é particularmente grave no intestino e, até o momento, não se encontra disponível no mercado uma droga eficiente para o tratamento da lesão de reperfusão, na rotina clínico-cirúrgica do abdome agudo em eqüinos (RIO TINTO et al., 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histofisiopatogenia do intestino delgado dos eqüinos

O sistema digestório, formado pelo tubo digestivo e suas glândulas anexas (fígado e pâncreas), têm como função retirar dos alimentos ingeridos os metabólitos necessários para o desenvolvimento e a manutenção do organismo. Para que isto aconteça, o alimento deve ser digerido e transformado em moléculas de fácil absorção através do epitélio do intestino delgado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NUNES & GUEDES, 2004).

Além de exercer a função primária de transformar alimento em metabólito e absorvê-lo o intestino delgado, especificamente a mucosa, deve fazer a discriminação contra substâncias que poderiam ser tóxicas se tivessem acesso ao organismo, mantendo ao mesmo tempo uma barreira entre o meio externo e o meio interno. O lúmen do trato gastrointestinal pode ser, portanto, considerado como “exterior” ao corpo. As células epiteliais que revestem o lúmen são as únicas barreiras entre esse ambiente “externo” e o sangue (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; ARGENZIO, 1996).

O intestino delgado dos eqüinos varia em seu comprimento entre 10 a 30 metros, com uma média de 25 metros e, quando distendido, seu diâmetro oscila entre 7,5 a 10 centímetros e sua capacidade é de cerca de 40 a 50 litros. É anatomicamente dividido em uma parte fixa e uma mesentérica. A parte fixa é denominada duodeno e a mesentérica é arbitrariamente dividida em partes chamadas jejuno e íleo (SISSON, 1986; MOORE, 1999).

O jejuno mede 17 a 28 metros no eqüino adulto e está situado principalmente no quadrante dorsal esquerdo do abdome, entre as voltas do cólon menor, ele é suprimido pela artéria mesentérica cranial (um ramo da aorta), disposta em arcos no mesentério (ao longo do mesojejuno - 40 a 60 centímetros), permitindo ao jejuno muita mobilidade e proporcionando, assim, circulação colateral abundante em seus limites distais. Cada arco vascular é composto por um vaso jejunal principal, que é um vaso arqueado, formando uma volta com o

próximo vaso jejunal, e vários vasos retos que passam do vaso arqueado para a parede intestinal sanguíneo (MOORE, 1999).

As veias que drenam o intestino delgado correm paralelas ao suplemento arterial e desembocam no sistema venoso portal. Os canais linfáticos do jejuno e íleo comunicam-se com os linfonodos mesentéricos. O intestino delgado é inervado por fibras simpáticas do plexo celíaco e gânglios e por fibras parassimpáticas do nervo vago (SISSON, 1986; MOORE, 1999).

É fundamental compreender a anatomia microscópica do intestino delgado para avaliar sua função em condições de saúde e doença. A parede do intestino delgado é composta por quatro camadas, sendo a primeira, mais próxima ao lúmen, a túnica mucosa (epitélio, lâmina própria e *muscularis mucosae*) seguida pela túnica submucosa, túnica muscular própria e túnica serosa ou adventícia (SISSON, 1986; NUNES & GUEDES, 2004).

O intestino delgado possui vilosidades, que são projeções da lâmina própria, recobertas por epitélio simples prismático com células caliciformes e microvilosidades. O número, forma e altura das vilosidades são variáveis com a localização, espécie animal, idade, microflora intestinal e estado imunológico. O intestino delgado possui criptas (criptas de Lieberkühn) que são estruturas semelhantes a glândulas revestidas por epitélio simples, com forma variável conforme a espécie e estado proliferativo. Nas criptas reside o compartimento proliferativo (progenitor) do epitélio intestinal que produz células que se diferenciam e se movem para o topo e superfície das vilosidades (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NUNES & GUEDES, 2004).

As principais células intestinais são os enterócitos, responsáveis pela digestão final e absorção de nutrientes, eletrólitos e água. São as células predominantes nas vilosidades que aumentam a superfície de absorção (orla em escova). Embebida no plasmalema dos microvilos estão inúmeras enzimas (aminopeptidase e dissacaridaseses), proteínas de ligação (do cálcio, da vitamina B12 e de outras vitaminas solúveis) e proteínas de transporte intracelular, acopladas com o transporte de íons sódio (NUNES & GUEDES, 2004).

O suprimento vascular da mucosa origina-se das artérias submucosas que emitem arteríolas, algumas das quais se ramificam em um plexo capilar em torno das criptas. A maioria atravessa o centro das vilosidades e se ramifica

próximo ao topo, em um denso plexo. Os capilares dos vilos são fenestrados na face voltada para a membrana basal. Uma ou mais vênulas drenam o sangue dos capilares, nas vilosidades e entre as criptas, e desembocam em grandes veias da submucosa, que terminam nas veias mesentéricas e circulação portal (BANKS, 1991; NUNES & GUEDES, 2004).

No intestino delgado isquêmico do eqüino, a principal lesão histológica é o desprendimento das células da mucosa, que começa no ápice das vilosidades e progride em direção á base, à medida que a isquemia continua. Após três horas de isquemia, toda a lâmina própria das vilosidades já se apresenta exposta e, com cinco a sete horas, a necrose atinge as camadas musculares. Assim que a barreira epitelial é rompida, as bactérias e endotoxinas penetram na lâmina própria. As endotoxinas agem sensibilizando macrófagos, neutrófilos e células endoteliais provocando uma reação inflamatória sistêmica, que se caracteriza, entre outros, por aumento na permeabilidade vascular, agregação plaquetária predispondo à trombose microvascular, marginação de neutrófilos e sintomas sistêmicos de choque circulatório. As bactérias podem migrar pela parede intestinal, contaminando tecidos adjacentes e provocando peritonite e gangrena. Se o quadro de isquemia for revertido a tempo, ocorre regeneração da mucosa. Um estudo avaliando alças de jejunos, que sofreram isquemia por até três horas, revelou que, em alguns segmentos, ocorreu reepitelização nas primeiras doze horas de reperfusão. Contudo, podem aparecer complicações posteriores como fibroses, estenose, abscessos, aderências e ulceração de mucosa (FALEIROS, 2000).

2.2 Isquemia e reperfusão

2.2.1 Patogênese da isquemia

A isquemia se caracteriza por um processo degenerativo, desencadeado a partir do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial e/ou drenagem venosa em um tecido, tanto por uma constrição mecânica ou funcional, em que há comprometimento da oferta de substratos metabólicos e oxigênio, fornecidos pelo

sangue corrente, incluindo a glicose (MOORE, 1999; COTRAN et al., 2000; FALEIROS, 2000).

A isquemia intestinal em eqüinos acontece basicamente devido a três mecanismos, que podem ser classificados como: obstrução simples, obstrução estrangulativa e infarto não estrangulativo ou tromboembólico. Nas obstruções simples ocorre obstrução do lúmen intestinal, por obstrução intraluminal, aumento de volume na parede intestinal ou compressão externa. As obstruções estrangulativas se caracterizam por ser parciais ou totais, tanto no lúmen intestinal quanto da irrigação local. Tais alterações são provocadas por torções do mesentério ou por encarceramento da alça intestinal em aberturas naturais ou atípicas nas cavidades abdominal e pélvica (ruptura de mesentério, forame epiplóico) ou extra-abdominal (escroto, diafragma) ou ainda pode resultar da torção do mesentério associado ao volvo. Nesse processo a isquemia ocorre por oclusão direta da vasculatura que, quando predominantemente venosa, denomina-se obstrução estrangulativa hemorrágica e quando arteriovenosa denomina-se obstrução estrangulativa isquêmica. A obstrução estrangulante hemorrágica (HSO) envolve, principalmente, oclusão venosa com fluxo arterial contínuo, o que resulta em congestão, hemorragia e edema da parede intestinal. A parede intestinal e o mesentério tornam-se usualmente vermelho-escuros a roxos e também espessos devido a um aumento da pressão hidrostática associada á oclusão venosa e aumento da permeabilidade microvascular induzida por mediadores inflamatórios liberados em resposta a isquemia intestinal. A obstrução estrangulante isquêmica (ISO) envolve oclusão arterial e venosa simultaneamente. Uma vez que o suplemento arterial corre paralelo ao retorno venoso, a pressão hidrostática capilar não aumenta e há menos hemorragia e edema em comparação ao HSO; a serosa torna-se manchada e cianótica. O infarto não estrangulativo intestinal ocorre devido á obstrução interna na vasculatura que pode ocorrer secundariamente a doenças vasculares oclusivas como obstrução intravascular associada a migração da larva de *Strongylus vulgaris*), ou ainda de forma não oclusiva como no choque hipovolêmico ou no endotóxico pela redução no fluxo sanguíneo e oxigenação devido a um desvio do sangue do leito vascular esplênico (MOORE, 1999; FALEIROS, 2000).

A reversibilidade da lesão celular resultante de isquemia e reperfusão

dependem muito da gravidade da isquemia. Modelos experimentais de isquemia não oclusiva demonstram que a circulação do intestino delgado é capaz de regular o fluxo sanguíneo durante períodos de baixa pressão de perfusão. À medida que a pressão de perfusão cai, o fluxo sanguíneo para os tecidos finalmente diminui, mas a eficiência da captação de oxigênio pelo tecido intestinal aumenta. Quando o fluxo sanguíneo cai abaixo de nível crítico, os sistemas reguladores não são mais eficazes, e a captação de oxigênio pelos tecidos diminui, resultando, finalmente, em lesão tecidual (JONES ¹, 2000).

Reduções significativas no fluxo sanguíneo rompem os padrões metabólicos e bioenergéticos normais das células, logo, o primeiro ponto de ataque da hipóxia é a respiração aeróbia celular. Devido ao seu papel na produção de energia, o oxigênio é essencial para o funcionamento normal da célula e, definitivamente para a sobrevivência celular. A maior parte do consumo de oxigênio na célula ocorre na mitocôndria, onde o oxigênio é reduzido à água pela cadeia de transporte de elétrons. Esse processo é emparelhado à síntese de trifosfato de adenosina, a maior fonte de energia na maioria das células. A privação de oxigênio leva a falha na fosforilação oxidativa e diminuição na produção de ATP, que é necessário para a demanda metabólica celular (COTRAN et al., 2000; FALEIROS, 2000).

A concentração reduzida de ATP resulta em inatividade do mecanismo da bomba de íons sódio-potássio, necessário para a manutenção de uma tensão osmótica apropriada no interior celular (Figura 1). As células não se encontram em equilíbrio no seu meio-ambiente, e assim há necessidade de um processo ativo, dependente de energia (a bomba de íons sódio-potássio) para contrabalançar a difusão do sódio e da água para dentro da célula, e do potássio para fora, através da membrana celular permeável. A diminuição da atividade da bomba de íons sódio-potássio é seguida por um influxo de sódio e cálcio para dentro da célula e pela difusão de potássio e magnésio para fora da célula, ocorrendo intumescimento celular à medida que se acumulam sódio, ácido lático e outros metabólitos inorgânicos osmoticamente ativos. Temporariamente, a via glicolítica anaeróbica fornece ATP. A glicólise resulta na liberação e acúmulo de ácido lático e de outros ácidos orgânicos, a partir da hidrólise de ésteres do fosfato, o que reduz o pH intracelular resultando na inibição enzimática, sobretudo da enzima

fosfofrutoquinase, o que reduz ainda mais a produção do ATP (COTRAN et al., 2000; JONES² et al., 2000).

O pH reduzido lesa as membranas celulares, incluindo as membranas lisossômicas, resultando na liberação e na ativação de enzimas lisossômicas para o citosol, lesando ainda mais as membranas celulares (Figura 1). A ruptura da membrana celular com relação ao citoesqueleto é consequência da diminuição do ATP que também resulta numa diminuição da síntese das proteínas, e que fica ainda mais comprometida pela perda do potássio, tornando as membranas mitocondriais permeáveis, permitindo que a água se difunda para sua matriz, fazendo com que sofra tumefação, semelhantemente ao ilustrado pela Figura 1 (JONES² et al., 2000).

O consumo do estoque do ATP continua sendo degradado a adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, a adenosina, inosina e hipoxantina (SILVA Jr. et al., 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003).

Sabe-se que, em condições fisiológicas, o cálcio livre no citosol é mantido em concentrações baixíssimas em comparação aos níveis extracelulares e a maior parte do cálcio intracelular está seqüestrada nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Durante a isquemia há um aumento inicial da concentração citosólica de cálcio devido ao influxo líquido através da membrana plasmática lesionada e a sua liberação das mitocôndrias e retículo endoplasmático, como mostrado na Figura 1 (COTRAN et al., 2000).

O cálcio ingressa na célula lesionada e se precipita com o fosfato presente nas membranas celulares internas, que ativa a fosfolipase endógena, uma enzima envolvida na renovação normal das membranas celulares. Isso, por sua vez, promove a degradação dos fosfolipídios da membrana celular a ácidos graxos livres, resultando em lesão e disfunção ainda maiores. Ácidos graxos livres não esterificados, que se acumulam no citosol, por sua vez, lesionam ainda mais as membranas celulares, devido ao seu efeito detergente. Acredita-se que o aumento do cálcio livre no citosol, resultante da lesão da membrana, seja o fator mais crítico na determinação da morte celular. Sabe-se que diversas enzimas envolvidas na degradação dos diversos componentes da célula são dependentes do cálcio e, deste modo, podem ser ativadas pelo aumento na concentração desse cátion (JONES et al., 2000).

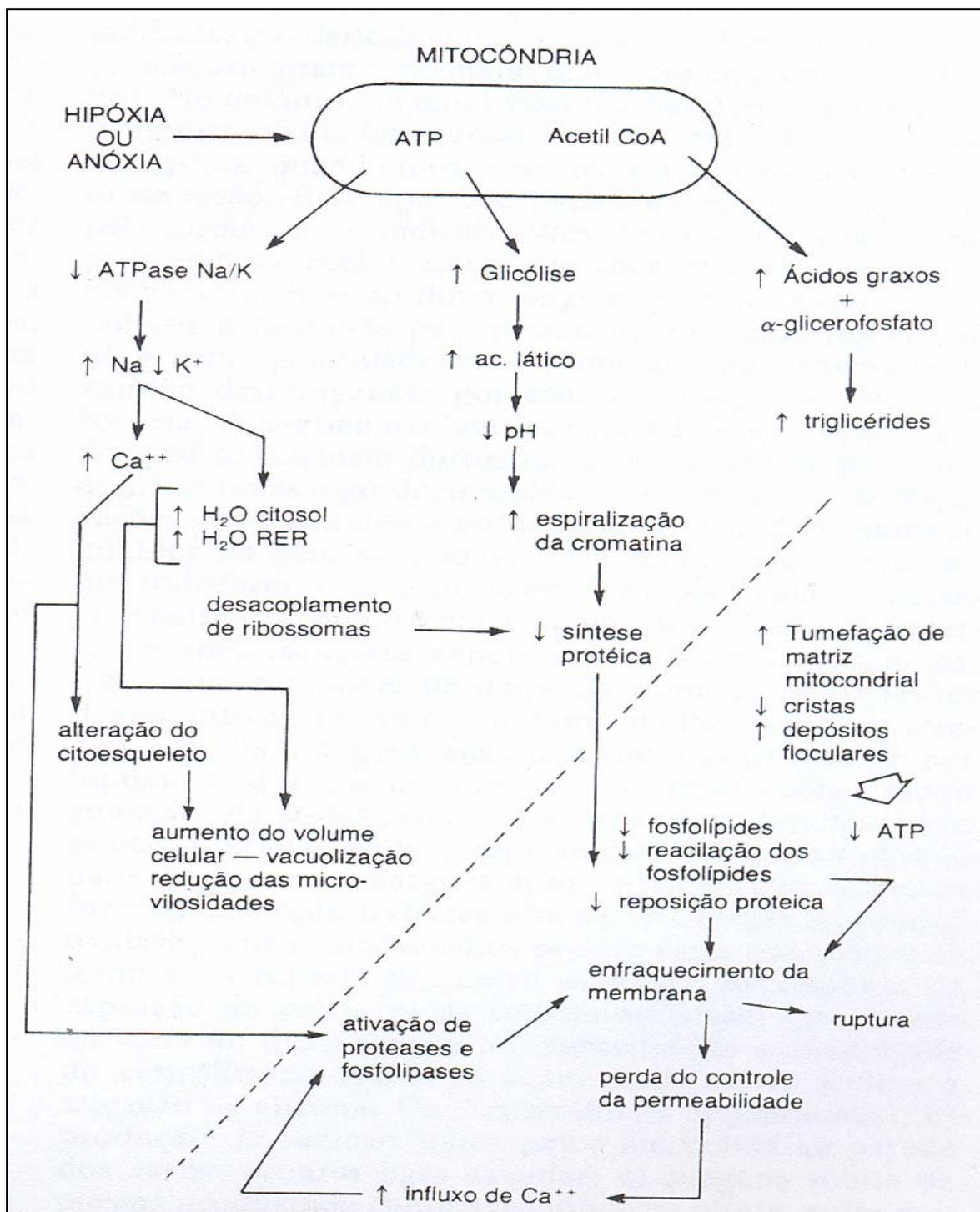


FIGURA 1 – Efeitos gerais da hipóxia sobre a célula. A linha tracejada separa as alterações reversíveis das irreversíveis (PEREIRA, 1989)

Eventualmente há liberação de proteases, lipase e outras enzimas de degradação de substratos, oriundas do lisossomo, que iniciam uma destruição autolítica das organelas celulares tornando a lesão celular irreversível e levando à célula à morte (MOORE¹ et al., 1995).

Qualquer intervenção que atenuar o aumento de cálcio citosólico reduz a disfunção e morte de células (JONES¹ et al., 2000).

Alterações ultra-estruturais observadas com o uso de microscopia eletrônica de transmissão durante isquemia ocorrem muito antes do que pode detectar-se pela microscopia óptica. Lesões nas mitocôndrias, no retículo plasmático rugoso, na membrana nuclear e na membrana basal são detectáveis dentro de 10 minutos de isquemia completa no intestino delgado de cão. A função das organelas celulares também muda durante certos períodos de isquemia. O consumo de oxigênio e as concentrações de fosfato de alta energia (ATP) diminuem 25% e 50%, respectivamente, após 30 minutos de isquemia (COTRAN et al., 2000; JONES¹ et al., 2000).

Durante HSO ou ISO no intestino delgado, fluido é seqüestrado no espaço subepitelial e o epitélio começa a desatar-se das suas aderências subjacentes até a membrana basal na extremidade do vilão. Esta separação progride descendente e juntamente ao vilão em direção às criptas. Os vilões são completamente desprovidos de epitélio em três horas após indução experimental de obstrução estrangulante intestinal e os vilões contraem-se de volta ao nível das criptas. Completa necrose da mucosa epitelial que se estende para a base das criptas ocorre entre quatro a cinco horas, e de seis a sete horas a degeneração progride visivelmente para além das camadas musculares. Com bases em estudos morfológicos do intestino delgado e no cólon, entretanto, a separação física de células intestinais pela formação de líquido subepitelial provavelmente ocorre antes de lesão bioquímica irreversível e provavelmente seja responsável por lesão permanente nas células (MOORE, 1999; JONES¹ et al., 2000).

A progressão da injúria da mucosa epitelial pode levar a necrose completa da mucosa com ruptura da barreira mucosa o que permite que bactérias luminiais e endotoxinas ganhem acesso a circulação sistêmica, resultando em endotoxemia. Além disso, o seqüestro de grandes volumes de fluido na parede, lume e mesentério intestinais resulta em hipovolemia. Uma vez não tratados os

animais acometidos por isquemias severas morrem por choque hipovolêmico e endotoxêmico. Mesmo com intervenção cirúrgica o prognóstico geral para a sobrevivência de cavalos com obstrução estrangulante intestinal é reservado. Se cavalos sobreviverem ao período inicial de necrose de mucosa e desprendimento epitelial e se houverem enterócitos viáveis, a mucosa pode reparar-se por conta própria. Mecanismos de reparação desenvolvem-se no trato intestinal para restabelecer rapidamente a continuidade epitelial após injúria intestinal, incluindo contração do vilosidade e recobrimento de áreas do vilosidade desprovidas de células epiteliais por migração de enterócitos que permaneceram viáveis. A mucosa pode ser completamente recoberta por epitélio em 12 a 24 horas após a injúria por isquemia (MOORE, 1999).

O tecido do cólon eqüino é mais resistente à lesão isquêmica do que o tecido do intestino delgado. A duração requerida para produzir lesão morfológica grave no cólon de eqüino é, em média, 25% mais longa do que no intestino delgado (240 *versus* 180 min.). Enquanto no cólon a mucosa é a camada mais susceptível à lesão isquêmica, no intestino delgado o ápice das vilosidades é a região mais susceptível à lesão por isquemia, em grande parte por causa do mecanismo de troca por contracorrente de fluxo sanguíneo nas vilosidades do intestino delgado. A base recebe concentração de oxigênio maior que o ápice, tornando a região apical da vilosidade relativamente mais hipóxica que a base e mais sensível a alterações na concentração do oxigênio sanguíneo (JONES¹ et al., 2000).

A injúria intestinal que acontece após o estrangulamento normalmente progride após correção cirúrgica devida às alterações irreversíveis celulares que ocorrem durante o período de isquemia ou é subsequente a cascata de eventos iniciados na reperfusão (MOORE, 1999).

2.2.2 Patogênese da lesão por isquemia e reperfusão

Reperfusão é o termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia (EVORA et al., 1994).

O restabelecimento do fluxo sanguíneo e da suplementação do oxigênio em tecidos que sofreram isquemia é necessário para restabelecer a função normal e

reparar os componentes danificados. Sabe-se que as conseqüências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração, porém, a recuperação da perfusão tecidual e oxigenação são capazes de iniciar reações bioquímicas deletérias que contribuem para danos teciduais tardios. Este fenômeno é chamado de lesão por isquemia/ reperfusão (I/R) (MOORE, 1999; SILVA Jr. et al., 2002).

Muitos eventos acontecem durante a isquemia que preparam o cenário para a produção de radicais livres na reperfusão. O evento inicial na injúria por reperfusão é a produção de radicais livres de oxigênio (MOORE, 1999).

Na maioria dos átomos, as órbitas de elétrons são preenchidas por elétrons pareados que giram em direções opostas, assim anulando a reatividade físico-química uns dos outros. Radical livre (espécies reativas de oxigênio) é o termo utilizado para caracterizar moléculas que contém elétron não pareado na última camada em uma órbita externa (COTRAN et al., 2000; JONES² et al., 2000).

O elétron não pareado torna esses radicais instáveis e extremamente reativos com muitos agentes químicos orgânicos e inorgânicos, particularmente os lipídeos e proteínas de membrana (metionina, histidina, cisteína e lisina) e nucleotídeos de DNA. Os radicais livres são notórios por iniciarem reações autocatalíticas, nas quais os agentes químicos com os quais reagem são por sua vez convertidos em radicais livres, tornando-se assim disponíveis para a propagação da lesão celular (PEREIRA, 1989; JONES² et al., 2000).

Sob circunstâncias normais, a maior parte do oxigênio é utilizada nas células para oxidar substratos energéticos por meio da enzima citocromo oxidase. Nessa reação o oxigênio recebe quatro elétrons e é reduzido em água, o que se chama fosforilação oxidativa. Isso ocorre como uma série de reações, começando com a redução de um elétron de oxigênio, formando o ânion superóxido (HO_2^-), que é reduzido por outro elétron para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma redução do peróxido de hidrogênio leva a formação do radical hidroxila (HO^-) que é reduzido por um quarto elétron à água (MOORE et al., 1995; FALEIROS, 2000).

Os produtos da redução do oxigênio por até três elétrons são conhecidos como radicais livres do oxigênio. Os radicais superóxido e hidroxila são altamente instáveis, podendo reagir com qualquer macromolécula biológica alterando sua conformação e, conseqüentemente, provocando danos celulares. O radical hidroxil é considerado o mais reativo, podendo reagir inclusive com moléculas de DNA. O

peróxido de hidrogênio é um agente oxidante menos potente. Contudo, na presença de íons de metais de transição como o ferro, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radicais hidroxil por meio da reação de Fenton ou reação de Haber-Weiss (FALEIROS, 2000).

Em condições normais nas células, a ocorrência de radicais livres é pequena e existem mecanismos de proteção naturais que promovem a inativação enzimática do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio, antes da formação do radical mais reativo, o radical hidroxil. Essas defesas específicas são constituídas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Existe ainda uma segunda linha de defesa que é composta por antioxidantes não enzimáticos, incluindo as vitaminas E e A, os β -carotenos, o ascorbato e os compostos sulfidríla e tio-éter (DROY-LEFAIX et al., 1991; MOORE, 1999; FALEIROS, 2000).

Em pequenas concentrações, os radicais livres parecem ter uma participação benéfica nos processos de eliminação de microorganismos pelos neutrófilos, na síntese de eicosanóides e na diferenciação celular. Porém, após um período transitório de isquemia verificam-se altas concentrações de radicais livres nos tecidos, além do acúmulo de altas concentrações de cálcio no citossol, que ativa as enzimas degradantes dependentes de cálcio (FALEIROS, 2000; JONES¹ et al., 2000).

Em tecidos sadios, a xantina desidrogenase (XD), uma enzima normalmente presente na mucosa epitelial e endotelial, participa do metabolismo do ATP, transformando hipoxantina em xantina e em ácido úrico que é eliminado pelos rins. Durante a isquemia e, conseqüentemente ao acúmulo de cálcio no citossol, a xantina desidrogenase é convertida à enzima xantina oxigenase (XO) pela ativação de uma protease cálcio dependente denominada calpaína, que promove a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da XO (Figura 2). A XO precisa de oxigênio para realizar a conversão de hipoxantina em xantina e, como não há oxigênio, a hipoxantina fica acumulada. (FALEIROS, 2000; SILVA JR et al., 2002; TARDINI & YOSHODA, 2003).

Com a reperfusão, a hipoxantina seria oxidada em xantina e esta em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação do ânion superóxido (O_2^-), de modo a ultrapassar a capacidade antioxidante da célula (MOORE, 1999;

JONES, SNYDER & SPIER, 2000; SILVA JR. et al., 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003). Logo, o superóxido é gerado por reações auto-oxidativas e de oxidases, respectivamente nas mitocôndrias e no citoplasma. Oxidases também são encontradas em células fagocíticas residentes e microvasculares e em células epiteliais mucosas (DROY-LEFAIX et al., 1991; JONES¹ et al., 2000).

Os radicais superóxidos são convertidos em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase. Superóxido e peróxido de hidrogênio reagem, formando radical hidroxila através da via ferro-dependente Haber-Weiss. Durante a reperfusão uma superabundância destes radicais é gerada sobrepassando os mecanismos de defesa tecidual antioxidante (DROY-LEFAIX et al., 1991; MOORE, 1999).

Como efeitos primários, os radicais livres agem diretamente produzindo aumento na permeabilidade vascular, estimulação de macrófagos, peroxidação de lipídeos, lesão das membranas celulares e alterações na estrutura do DNA. A lipoperoxidação da membrana celular leva também a geração de mediadores derivados de fosfolipídeos que exerce numerosos efeitos inflamatórios. Leucotrieno B₄, e o fator de ativação plaquetária (FAP) são dois mediadores derivados de fosfolipídeos que são produzidos subsequentemente à lipoperoxidação e são potentes quimioatraentes para neutrófilos (MOORE, 1999; FALEIROS, 2000).

Os neutrófilos infiltrados no tecido lesado, por sua vez, são responsáveis pela liberação de proteases e por uma “segunda onda” de produção de radicais livres. Os neutrófilos são capazes de transformar oxigênio em íon superóxido via NADPH oxidase, que é metabolizado em peróxido de hidrogênio. Esse, por sua vez, em presença de íons de cloro é transformado, por meio da mieloperoxidase originária dos neutrófilos, em ácido hipocloroso (HOCl), substância extremamente tóxica (MOORE, 1997).

Contudo, este processo não se limita apenas aos radicais livres. Ainda secundariamente ao aumento intracelular de cálcio durante a isquemia, haveria formação do óxido nítrico, um gás lábil, conhecido como fator relaxante do endotélio (EDRF), a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS) cálcio dependente (EVORA et al., 1994; MOORE, 1999; RHODEN et al., 2001; CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; TARDINI & YOSHIDA, 2003). O óxido nítrico é também um radical livre, produzido fisiologicamente pela enzima óxido nítrico sintetase nos macrófagos, neutrófilos,

fibroblastos, células endoteliais e musculatura lisa. Sua função está relacionada à modulação do tônus vascular mediada via cGMP e também com a resposta inflamatória e alterações na circulação local (inibição plaquetária e neutrofílica) podendo, em altas concentrações, ser tóxico para células tumorais e microorganismos. NO é capaz de difundir-se diretamente através da membrana plasmática das suas células alvo. Uma vez sintetizado, NO difunde-se para fora da célula e pode agir localmente para afetar células adjacentes. Esta ação é restrita a tais efeitos locais porque NO é extremamente instável, com uma meia-vida de apenas alguns segundos (COOPER, 2001; MOORE, MUIR & GRANGER, 1995).

RHODEN et al (2001) propuseram que o NO tenha um papel ambíguo durante a I/R tecidual. Durante a isquemia, ele parece proteger o tecido devido sua propriedade vasodilatadora e ação contra acúmulo leucocitário. Contudo, após a reoxigenação do tecido isquêmico, o NO pode reagir com moléculas de superóxido e formar o radical peroxinitrito (ONOO⁻), um importante agente causador da lipoperoxidação de membranas celulares (Figura 2). Isso ocorre porque há duas isoformas principais de ácido nítrico sintetase (NOS):

1. Constitutiva (Cnos), que é presente basalmente nas células endoteliais e responsável pela produção de pequenas quantidades de NO por curtos períodos. Ela parece mediar os efeitos fisiológicos ou citoprotetores da vasodilatação, diminuição da agregação e adesão plaquetária e diminuição da adesão neutrofílica. Estes efeitos deveriam ser protetores contra a injúria de I/R.
2. Induzível (Inos), que não é presente basalmente nas células, mas é expressa em certas células (especialmente leucócitos como os macrófagos e neutrófilos) em resposta a citocinas ou outros estímulos inflamatórios, resultando na produção de largas quantidades de NO por períodos prolongados. Acredita-se que o NO produzido na via iNOS seja responsável por mediar os efeitos citotóxicos ou patológicos do NO. Verifica-se que a terapêutica com inibidores de NO pode ser benéfica no controle após isquemia intestinal generalizada, provavelmente por ação inibitória da adesão de neutrófilos (MOORE, 1999; FALEIROS, 2000).

Os neutrófilos têm mostrado desenvolver um papel principal na patofisiologia da injúria por isquemia-reperfusão. Além dos radicais livres de oxigênio derivados de XO iniciarem o recrutamento e ativação de neutrófilos em intestino pós-isquemiado, os radicais de oxigênio livre derivados de neutrófilos subsequentemente mediam ou exacerbam a injúria da mucosa intestinal, como observado na Figura 2.

Ambos os neutrófilos residentes no interstício e intravascularmente estão envolvidos na injúria tecidual associada à isquemia-reperfusão. Enquanto leucócitos intravasculares parecem mediar o aumento na permeabilidade microvascular, os granulócitos residentes intersticialmente contribuem mais para o aumento de permeabilidade da mucosa (MOORE, 1999; SUN et al., 2000).

Durante isquemia e perfusão precoce, há síntese e liberação de muitos outros quimioatraentes; os neutrófilos são sinalizados a ir para o tecido afetado, onde sofrem adesão mediada por receptor ao endotélio venular pós-capilar e subsequente diapedese para os tecidos. A ativação destes neutrófilos leva a síntese e liberação de numerosas enzimas (proteases) e radicais livres que contribuem com a injúria microvascular e de mucosa. A inibição da adesão de neutrófilos ou depleção de neutrófilos vem demonstrando reduzir injúria do trato gastrointestinal associada à isquemia e perfusão (MOORE, 1999).

SUN et al (2000) concluíram em um trabalho científico que avaliou a função fagocítica e das barreiras intestinal e endotelial durante o estágio inicial da injúria por isquemia e perfusão em intestino delgado de ratos, que I/R danifica a barreira intestinal não apenas por causar hipóxia, mas também pela ativação do sistema fagocítico agravando os danos à barreira, o que pode, finalmente, resultar em translocação bacteriana e disfunção em órgãos remotos.

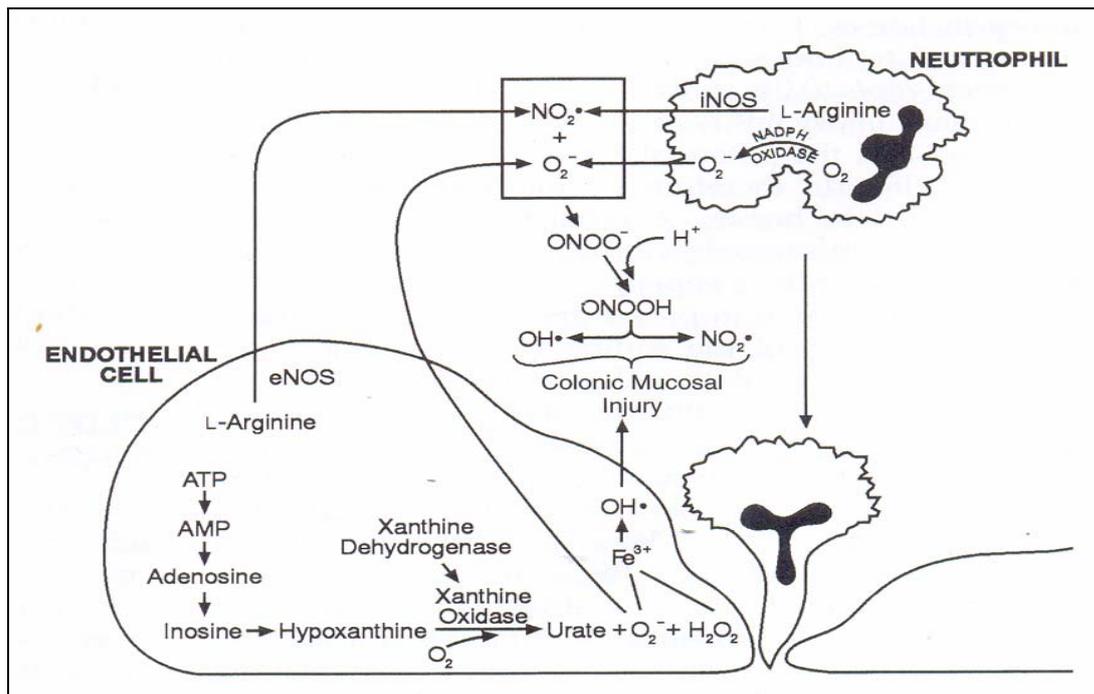


FIGURA 2 – Mecanismos propostos da injúria por isquemia e reperfusão intestinal (MOORE, 1999)

2.3 Junções Intercelulares

A adesão célula a célula é importante para o desenvolvimento da organização multicelular. Várias estruturas associadas à membrana plasmática contribuem para a coesão e a comunicação entre as células. Elas estão presentes na maioria dos tecidos, mas são muito abundantes em epitélios (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NAGAFUCHI, 2001).

As células epiteliais apresentam uma intensa adesão múltipla e, para separá-las são necessárias forças mecânicas relativamente grandes. A adesão entre as células é em parte devida à ação coesiva dos membros de uma família de glicoproteínas transmembranas cálcio-dependentes chamadas caderinas, pertencentes à grande classe das Junções de Aderência (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Além dos efeitos coesivos dessas macromoléculas intercelulares, as membranas laterais de muitos tipos de células epiteliais exibem várias especializações que constituem as junções intercelulares. Os vários tipos de junções servem não só como locais de adesão, mas eventualmente também como

vedantes prevenindo o fluxo de materiais pelo espaço intercelular e ainda podem oferecer canais para a comunicação entre as células adjacentes. Portanto, sob o ponto de vista funcional as junções podem ser classificadas como junções de adesão (JA), junções impermeáveis ou de oclusão (JO) e junções de comunicação. Estas junções formam complexos juncionais na parte mais apical das membranas laterais, em uma seqüência constante do ápice para a base das células (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; NAGAFUCHI, 2001).

Nas zônulas de oclusão, o termo “zônula” indica que a junção forma uma faixa ou cinturão que circunda a célula completamente e “oclusão” se refere á fusão das membranas que ocorre nestas junções, vedando o espaço intercelular. Assim, a função principal da junção de adesão é promover uma vedação que impede o movimento de materiais entre células epiteliais (via paracelular), tanto do ápice para a base como da base para o ápice (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

2.3.1 Junções de aderência (JA)

As forças mecânicas entre as células possuem um objetivo principal na organização dos tecidos animais. As junções de aderência (JA) são um componente importante destes tecidos, uma vez que são junções adesivas que mediam a adesão dependente de cálcio e ancoram a actina do citoesqueleto entre células vizinhas. A matriz citoplasmática exibe uma rede complexa constituída de filamentos de actina (microfilamentos), microtúbulos e filamentos intermediários. Estas proteínas estruturais constituem o citoesqueleto, que fornece sustentação para as células e também apresenta funções como o estabelecimento da forma celular, provisão de força mecânica, separação do cromossomo na mitose e na meiose, transporte de organelas intracelulares, endocitose, exocitose, movimentação dos microvilos, contração muscular e migração das células. A principal proteína do citoesqueleto, na maioria das células, é a actina que polimeriza-se para formar filamentos de actina, constituindo 10% a 15% do total de proteínas na maioria das células (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; COOPER, 1997; GRIMSON et al., 2000; ARAÚJO, 2001).

As JA se estruturam em torno das caderinas, glicoproteínas transmembrânicas cujos domínios extracelulares interagem homologamente com

caderinas de células vizinhas através da formação de estruturas tensas (GRIMSON et al., 2000; ARAÚJO, 2001).

Os diversos tipos de caderinas de vertebrados são expressos em uma grande variedade de células. As caderinas são encontradas em vários tecidos do organismo, e foram denominadas de acordo com o tecido aonde foram descobertas ou são mais abundantes (ARAÚJO, 2001).

As chamadas caderinas clássicas são proteínas transmembrânicas compostas por regiões citoplasmáticas altamente conservadas e um domínio extracelular com cinco subdomínios estruturais contendo motivos de ligação de cálcio. São elas as E- caderina (E = epitelial), N - caderina (N = neuronal), P - caderina (P = placentária), VE - caderina (VE = vaso endotelial). Contudo, tais caderinas não são a totalidade desta família de glicoproteínas adesivas. Há muitas outras, incluindo uma caderina retinal (R) e uma caderina cerebral (B) (SUZUKI et al., 1991; ARAÚJO, 2001; BABB et al., 2005).

Os diversos tipos de caderinas apresentam semelhança estrutural entre si, mas a especificidade imunológica e as suas distribuições no organismo animal são variáveis como, por exemplo, a VE-caderina é exclusiva de endotélios, sendo utilizada inclusive como um marcador de endotélio. Estes componentes desempenham um papel na construção de tecidos e de todo o corpo animal (ARAÚJO, 2001).

A. Região extracelular

Os domínios extracelulares das caderinas mediam as adesões intercelulares cálcio-dependente através de interações hemofílicas. Ele pode ser dividido em cinco subdomínios baseados em seqüências de aminoácidos, conhecidos como EC1 – 5. O reconhecimento homofílico, específico a cada tipo de caderina, é o resultado de seqüências localizadas no segmento amino (N) terminal das moléculas, isto é, dentro da primeira repetição EC1, ilustrado na Figura 3. (ARAÚJO, 2001; WARY, 2005).

Diferentes análises sugerem que o cálcio, está envolvido na ligação dos cinco sobredomínios sucessivos para conferir a morfologia em forma de vara (ARAÚJO, 2001).

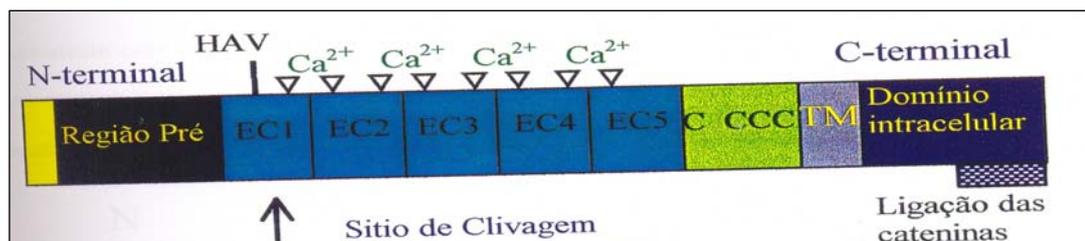


FIGURA 3 – Domínio extracelular da caderina (ARAÚJO, 2001).

A análise de Raios-X sugere que o domínio extracelular da caderina forma um dímero, no qual dois monômeros são arranjados em paralelo na membrana plasmática. Cada unidade do dímero interage com aquela do dímero correspondente na membrana oposta, formando um “dímero de adesão” na porção N-terminal. Considerando-se a estrutura como um todo, foi proposto que os dímeros são arranjados como um zíper no espaço intercelular. No entanto, outros estudos sugerem um modelo alternativo, que seria a formação de um oligômero cuja estrutura seria semelhante a um cilindro (ARAÚJO, 2001).

O sítio de reconhecimento homofílico das caderinas é provavelmente a seqüência tripeptídica histidina-alanina-valina (HAV), um código de letra único para aminoácidos que é conservado em muitas caderinas. Os aminoácidos adjacentes à seqüência HAV parecem críticos para a especificidade desta ligação (por ex. quando ele liga uma P-, E-, ou N- caderina). Estes aminoácidos que flanqueiam o motivo HAV, são localizados na interface de adesão do dímero, o que é consistente com o papel que é proposto. Mutações nesta região inibem severamente as ligações célula a célula, e peptídios sintéticos contendo esta seqüência podem inibir a adesão célula a célula pela competição com as caderinas das células para adesão (BLASCHUK, 1990; ARAÚJO, 2001).

B. Região intracelular

Para desempenhar seu papel na adesão célula a célula, a molécula transmembrânica caderina precisa associar-se ao citoesqueleto via proteínas citoplasmáticas conhecidas como cateninas. As cateninas ligam as moléculas de caderina à actina do citoesqueleto e também são responsáveis pela mediação de sinais intracelulares em resposta à adesão. Os componentes de sinalização da

caderina determinam a morfogênese epitelial e arquitetura dos tecidos. Três (102kD), β -catenina, (88kD) e cateninas foram identificadas: α -catenina γ -catenina (também conhecida como placaglobina) (80kD²²). β ou γ -catenina ligam a caderina à α -catenina, que por sua vez, liga o complexo caderina-catenina ao citoesqueleto de actina (α -catenina) (THE INTERACTIVE FLY, 1996; ARAÚJO, 2001).

Os genes que codificam a α -catenina foram clonados em vertebrados (incluindo mamíferos) e em *Drosophila*, além disso, a similiaridade de sua seqüência e da vinculina indica que a α -catenina é o principal âncora de ligação das JA com o citoesqueleto. Ambos os fragmentos amino (aa 128) e carbóxi (aa 461-907) terminais de alfa-catenina humana unem filamentos de actina *in vitro*. Sabe-se que actinina-alfa forma dímeros anti-paralelos. Dados que mostram uma interação entre pequenas regiões de alfa-catenina sugerem que uma molécula de alfa-catenina deve interagir com um membro do dímero da α – actinina. O sistema de dupla-hibridização foi usado para mapear os domínios de α -catenina que permitem a associação desta com a beta/ gama – catenina e com α -actinina. Uma região da α -actinina foi identificada como responsável pela sua interação com α -catenina. Os aminoácidos 6-506 da α -catenina interagem com os aminoácidos 479-892 da α -actinina (THE INTERACTIVE FLY, 1996).

O gene da β -catenina foi isolado de uma grande variedade de organismos vertebrados e invertebrados, sendo homólogo ao gene armadillo (Arm) da *Drosophila* (THE INTERACTIVE FLY, 1996; ARAÚJO, 2001).

A estrutura da β -catenina pode ser dividida em três domínios: uma região central de 12 a 13 cópias imperfeitas de repetições de 42 aminoácidos (Arm), flanqueados por domínios amino (N) e carbóxi (C) – terminais. A β -catenina está relacionada com o gene da γ -catenina ou placaglobina humana uma vez que Arm tem uma região N-terminal que é 43% homóloga à placaglobina humana, cópias centrais de repetições de aminoácido 70% idênticas à placaglobina e uma região C-terminal rica em glicina prolina 36% homóloga à placaglobina. As repetições Arm da β -catenina se ligam à caderina, e a região N-terminal se liga à α -catenina. Uma região de 30 aminoácidos do domínio citoplasmático da caderina é requerida para a interação com a β -catenina (ARAÚJO, 2001).

Armadillo (Arm) pode associar-se reversamente às junções de aderência, isto é, ele pode prender-se a elas ou deixá-las sozinha. A localização citoplasmática

do Arm é regulada por fosforilação, isto é, pelo acoplamento de um resíduo fosfato à uma proteína usando enzimas quinase. Este é o mecanismo principal da célula para comunicação intermolecular (THE INTERACTIVE FLY, 1996; ARAÚJO, 2001).

A expressão de E-caderina no desenvolvimento embrionário é muito precoce, ainda no estágio de apenas duas células. A diferenciação e polarização epitelial (processos fundamentais na diferenciação celular) ocorrem no princípio do estágio de mórula, onde o embrião se compacta e cada célula polariza-se longitudinalmente ao seu eixo apicobasal para gerar um fenótipo epitelial. A E-caderina desenvolve um importante papel na adesão dos blastômeros e na habilidade precoce do embrião em compactar-se. E-caderina é expressa na membrana ainda antes da compactação da mórula ocorrer, é distribuída de uma maneira não polar e não exibe qualquer função adesiva. O mecanismo que faz com que a E-caderina funcione é desconhecido, mas certamente inclui fosforilação da proteína. A conversão epitelial-mesenquimal controlada é a função mais importante demonstrada no desenvolvimento embrionário. A perda da adesão e polaridade epitelial causa a morfologia de célula mesenquimal e ocorre durante a formação da mesoderme (ŠLAUS, 2003).

A formação do complexo caderina/ β -catenina - γ -catenina/ α -catenina é um processo de etapas múltiplas. Imediatamente após a síntese no retículo endoplasmático, a caderina se associa à β ou à γ -catenina. O complexo é transportado até a membrana plasmática, e a α -catenina se adiciona concomitantemente à sua chegada. Com o passar do tempo a maioria dos complexos caderina/cateninas são recrutados para os contatos célula-célula mais estáveis (ARAÚJO, 2001).

A adesão mediada por caderinas é um processo dinâmico que é regulado por muitos caminhos de transdução de sinais. Há evidência que as caderinas não são apenas alvos para caminhos de sinalização que regulam a adesão, mas podem elas mesmas enviar sinais que regulem os processos básicos celulares, tais como migração, proliferação, apoptose e diferenciação celular (ŠLAUS, 2003).

As proteínas que se ligam à caderina são objetos de constante troca com moléculas individuais, ou com complexos α / β (ou γ) - catenina de *pools* intracelulares livres (ARAÚJO, 2001).

A β -catenina é normalmente encontrada no citoplasma da célula em localização submembranar. Mutações no gene da β -catenina resultam na acumulação nuclear desta proteína. A acumulação nuclear desta proteína tem sido demonstrada em lesões fibromatosas da mama e abdômen sendo, portanto, útil na diferenciação desta lesão de outras lesões de células fusão que podem ocorrer nestas localizações. A acumulação nuclear da β -catenina tem também sido demonstrada em carcinoma colorectal (ALMAN et al., 1997; LI et al., 1998; KUHLEN et al., 2000; ABRAHAM et al., 2002; MONTGOMERY et al., 2002).

Modificações na β -catenina parecem ocorrer de forma a agravar ainda mais a lesão tecidual causada em casos de isquemia seguida por reperfusão, desempenhando importante papel na patogênese da lesão, especialmente em células epiteliais e endoteliais intestinais (ARAÚJO, 2001; XIN GUO et al., 2003; WARY, 2005).

2.3.2 As Junções de oclusão (JO)

Há um século atrás, o termo junções “tipo *tight*” (zônula de oclusão) foi dado para o complexo juncional intercelular epitelial porque ele aparecia como uma região fundida entre células. Baseado em pesquisas ao longo dos últimos 40 anos o conceito de que as JO eram uma barreira impermeável, análoga ao cimento, mudou dramaticamente. Apesar da rápida evolução nos estudos, a compreensão da arquitetura e função das JO está longe de ser completa, está claro que a zônula de oclusão é uma estrutura multiproteica complexa e dinâmica que é seletivamente permeável a certas moléculas hidrofílicas tais como íons, nutrientes e drogas (WARD et al., 2000). O estabelecimento de compartimentos para fluidos de composições distintas pelo epitélio e endotélio é crucial para o desenvolvimento e função da maioria dos órgãos. As JO, um elemento dos complexos juncionais de células epiteliais e endoteliais, está diretamente envolvida na compartimentalização por selar as células para criar a barreira primária para a difusão de solutos através da via paracelular. As JO também funcionam como uma fronteira entre as superfícies apicais e basolaterais da membrana plasmática, que difere em proteínas, composição lipídica e funções

fisiológicas para criar e manter a polaridade celular epitelial e endotelial. Por isso, o interesse no atraente estudo das JO entre os biólogos celulares (FURUSE et al., 1994).

A. JO e seus papéis no transporte epitelial

Recentemente a morfologia e regulação das JO têm sido estudadas em grandes detalhes. A analogia atual usada para tais junções é a de um portão, porque estas junções permitem a passagem de pequenos compostos hidrofílicos, mas age como uma barreira para compostos maiores. As JO também são referidas como fronteiras ou cercas porque formam uma barreira de difusão intermembranas que restringe a mistura de componentes apicais e basolaterais limitando os movimentos das proteínas e lipídios do pólo apical para o basolateral da célula (e vice versa). Esta função de cerca das JO também mantém a polaridade dos enterócitos e não está diretamente relacionada à sua função de “portão”. A habilidade dos complexos juncionais em regular a função de cerca pode ser comprometida por numerosos estímulos como ruptura das JO dependentes de cálcio e infecções virais e bacterianas do epitélio simples intestinal (WARD et al., 2000; MUSH et al., 2005).

As moléculas atravessam o epitélio intestinal em direção ao sangue via três mecanismos principais: (1) difusão passiva entre as membranas celulares (via transcelular) com transporte direcional, dependente de energia e governado pelo perfil celular específico de canais nas membranas celulares apicais e basolaterais; (2) difusão passiva entre células adjacentes (via paracelular) com transporte passivo e resultado da difusão, eletrodifusão ou osmose a partir dos gradientes criados pelo mecanismo transcelular e (3) transporte mediado por carreadores (via transcelular mediada por carreadores) governado pelo perfil celular específico de transportadores posicionados nas membranas celulares apicais e basolaterais. As moléculas lipofílicas atravessam facilmente a membrana celular por difusão transcelular. Em contraste, moléculas hidrofílicas que não são reconhecidas por um carreador não podem partilhar para dentro da membrana hidrofóbica e, deste modo, atravessam transversalmente a barreira epitelial via paracelular. O transporte de moléculas

hidrofílicas via paracelular é, no entanto, severamente restringido pela presença das JO. A rota paracelular não mostra discriminação direcional; porém, ele varia grandemente entre os epitélios em termos de resistência elétrica e mostra pequenas diferenças na seletividade iônica. Assim, a via paracelular complementa o mecanismo transcelular por definir o grau e a seletividade de permeabilidade para íons e solutos fazendo uma importante contribuição tecido-específica para o transporte total (WARD et al., 2000; ANDERSON, 2001).

Alterações na barreira intestinal levam à translocação de macromoléculas que podem ser absorvidas dos vasos linfáticos ou diretamente alcançam a circulação intestinal o que permitiria a entrada de bactérias do lúmen através das camadas da mucosa causando complicações locais e sistêmicas podendo levar à morte (KUEBLER, et al., 2003)

B. Morfologia da JO e da ocludina

Adicionalmente, a complexidade funcional das JO está também refletida na sua arquitetura multiprotéica que junta domínios extracelulares, transmembrânicos e intracelulares das células. A JO é composta por um grupo de proteínas transmembranas e citosólicas que interagem não apenas umas com as outras, mas também com a membrana e o citoesqueleto. Na microscopia eletrônica por transmissão as JO aparecem como uma série de contatos celulares íntimos e, em microscopia por criofatura, os contatos correspondem a contínuas séries de partículas protéicas transmembrânicas. A barreira é criada onde as partículas se encontram no espaço paracelular (Figura 4). A questão ainda não respondida é se as porções extracelulares das partículas são interdigitadas como metades de um zíper ou encontram-se cabeça e cabeça. Em ambos os casos, a maneira pela qual estas proteínas entram em contato e preenchem o espaço intercelular determinam as propriedades da barreira. Uma regra geral é que a média do número de fibras encontrados ao longo do eixo apico-basal é proporcional à resistência elétrica da junção. A resistência varia entre as lâminas epiteliais mais “apertadas” e mais “frouxas”. O padrão morfológico das fibras também é variável entre os tecidos, por exemplo, quão paralelas ou ramificadas

elas são; porém até agora não há correlação fisiológica destas diferenças (WARD et al., 2000; ANDERSON, 2001).

O complexo juncional das JO envolve um grande número de proteínas associadas à membrana onde se encontram a ocludina, molécula de adesão juncional e as claudinas que são responsáveis pela formação das conexões físicas entre as células que conferem as propriedades básicas da barreira. Ocludina vem sendo extensivamente estudada e possui uma grande extensão citoplasmática que coordena com as proteínas juncionais do citosol. Ocludina associa-se com a primeira proteína associada às JO identificada, ZO-1 (proteína zônula ocludens 1). A ZO-1 interage não apenas com a ocludina, mas também com numerosas outras proteínas associadas às JO incluindo ZO-2, ZO3, β -catenina entre outras e, apesar de a ocludina ter sido descoberta muitos anos antes das claudinas sua função permanece obscura (ANDERSON, 2001; MUSCH et al., 2005).

Ocludina foi primeiramente identificada nas JO de fígado de galinhas e depois em várias espécies mamíferas. Esta proteína é uma proteína integral de membrana que apresenta quatro domínios transmembrânicos e um longo domínio citoplasmático COOH-terminal (domínio E) que consiste em 225 aminoácidos (FURUSE et al., 1994; WARD et al., 2000). Ocludina desempenha um duplo papel: prover integridade estrutural pra as JO e regular a função de barreira das mesmas. Os domínios extracelulares e N-terminal da ocludina provêm a integridade estrutural necessária para a função de barreira das JO. Desta forma, uma construção de ocludina que não apresentava os domínios N-terminal e extracelular pareceu enfraquecer a função de barreira das junções tipo tight. A presença da ocludina é, no entanto, não necessária para a formação das JO porque a ruptura do gene da ocludina em células tronco embrionárias não preveniu a formação de fibras funcionais. A cauda citoplasmática C-terminal da ocludina confere um papel regulatório por unir as proteínas associadas às junções de oclusão que interagem com o citoesqueleto e por ligar diretamente ao citoesqueleto. Interação das JO com citoesqueleto e o status de fosforilação provavelmente desenvolvem um importante papel na regulação da função das JO (WARD et al., 2000).

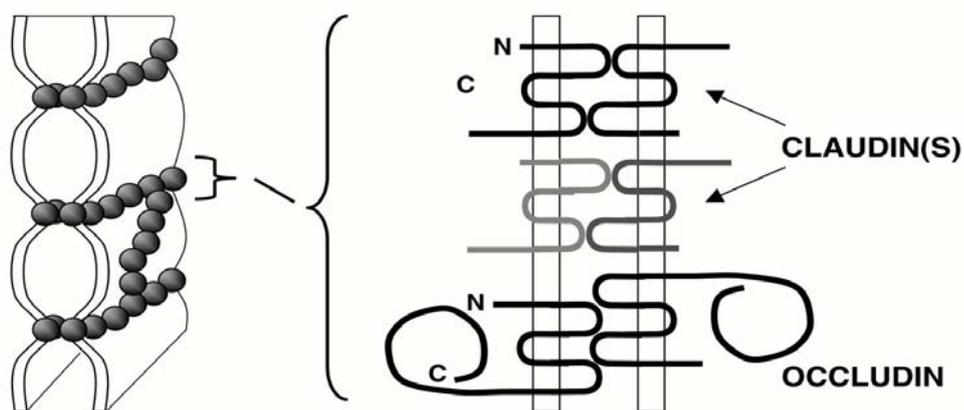


FIGURA 4 – Representação esquemática das proteínas transmembrânicas das JO, Ocludina e Claudina (ANDERSON, 2001).

2.3.3 Modelos experimentais de Isquemia e reperfusão intestinal

Vários estudos em eqüinos e pôneis vêm sendo realizados com o intuito de avaliar as alterações histopatológicas, bioquímicas e hemodinâmicas subseqüentes á isquemia e reperfusão intestinal, com ou sem prévio tratamento com agentes farmacológicos direcionados a interromperem os mecanismos patofisiológicos associados á injúria de reperfusão. Modelos de isquemia parcial e total arterial, venosa e arteriovenosa vêm sendo avaliados no intestino delgado e cólon maior de eqüinos, uma vez que, a magnitude da mudança da arquitetura e permeabilidade da mucosa é diretamente relacionada à duração do evento isquêmico. Isquemia parcial prolongada é capaz de causar o mesmo grau de injúria de uma isquemia completa (MOORE et al., 1995; MOORE, 1997).

Ainda segundo MOORE (1997), estudos retrospectivos indicaram que não há uma diferença histológica entre a injúria em jejunos de eqüinos após 180 minutos de obstrução apenas venosa e entre 90 minutos de isquemia seguida por 90 minutos de reperfusão. Tais achados indicam que a oclusão venosa causa mais danos severos e inflamação na mucosa do jejuno do que a reperfusão subseqüente, o que é contrastante ao paradigma clássico da injúria de reperfusão intestinal.

Em linhas gerais, os resultados da maioria dos estudos de isquemia e reperfusão no trato gastrointestinal de eqüinos indicaram que há uma evidência de dano tecidual, a maioria desses na mucosa intestinal (MOORE et al., 1994; MOORE, 1997).

Outros estudos têm sido feitos na tentativa de se verificar as causas da injúria de reperfusão no intestino de eqüinos. Esses estudos baseiam-se em trabalhos prévios com animais de laboratórios e têm sido conduzidos com substâncias indicadoras da presença de radicais livres de oxigênio na isquemia e reperfusão, assim como com a administração de drogas antioxidantes. Entretanto, os resultados mostram-se variáveis e ainda não existem definições concretas com relação aos métodos utilizados para quantificar os marcadores dessa lesão (FALEIROS, 2000).

Frente a todos os modelos experimentais delinados até o momento, o presente trabalho descartou o estudo experimental da lesão de isquemia e reperfusão em modelo de isquemia de oclusão parcial venosa para que o edema e a hemorragia fossem minimizados, uma vez que estas variáveis poderiam corromper a arquitetura tecidual e dificultar a detecção das alterações condizentes á reperfusão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudo da patogenia da lesão por isquemia arteriovenosa completa dos vasos mesentéricos e reperfusão jejunal em eqüinos por meio da avaliação da expressão das proteínas β -catenina e ocludina presentes neste epitélio.

3.2 Objetivos específicos

Avaliação histopatológica qualitativa da túnica mucosa, submucosa, muscular própria e serosa de jejuno de eqüinos em segmentos controles e tratados para isquemia e reperfusão.

Determinação imunoistoquímica da expressão das proteínas de junção intercelulares β -catenina e ocludina de jejuno de eqüinos nos segmentos controles e tratados para isquemia e reperfusão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos relativos à experimentação animal do presente trabalho estão de acordo com colégio brasileiro de experimentação animal – COBEA e com o capítulo IV do projeto de lei 1153/95 das condições de criação e uso de animais para ensino e pesquisa científica todo o território nacional e com o Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, mesmo não tendo sido submetido para comissão de ética na data da realização experimental pela inexistência de tal comissão.

4.1 Animais

Foram utilizados, sete eqüinos sem raça definida, com idades variando entre três a 20 anos de idade e peso corpóreo entre 250 e 350 Kg, sendo dois machos inteiros, dois machos castrados e três fêmeas, todos oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Goiânia. Os animais utilizados no experimento seriam encaminhados à eutanásia no CCZ-GO por tratarem-se de animais errantes apreendidos no estado. A utilização destes animais viabilizou parte do projeto diminuindo os custos relativos à obtenção de eqüinos. A origem dos eqüinos justifica a diversidade amostral relativa à faixa etária e sexo. Os animais foram transportados para as instalações da Sociedade Objetivo de Ensino Superior (SOES), Campus Goiânia - Flamboyant, Rodovia BR153, Km 503, Fazenda Botafogo, para a realização dos procedimentos experimentais.

Os critérios para inclusão dos animais na amostra foram: idade superior a dois anos, ausência de alterações cardiopulmonares, gastrointestinais ou outras doenças sistêmicas baseados em exames físicos completos e laboratoriais, como hemograma completo, urinálise e análise de fezes.

Os eqüinos foram medicados com sulfóxido de albendazol e triclorfon (Ricobendazole gel, Produtos Veterinários Ouro Fino Ltda, São Paulo) por via oral para o controle de endoparasitas. Todos os procedimentos foram realizados no hospital e laboratório de análises clínicas da SOES.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos

estabulados em baias devidamente higienizadas, com área de 4x4 metros cada e piso de borracha e alimentados com feno de *coast cross*, na proporção de 1% a 2% do peso corporal por dia e água à vontade. Este manejo foi mantido por até 10 dias antes dos procedimentos cirúrgicos para propiciar uma adaptação à dieta e ao ambiente hospitalar. Antes da cirurgia todos os animais foram submetidos a jejum alimentar por 12 horas para diminuição do conteúdo intestinal. Não se realizou restrição de água.

4.2 Tratamentos e delineamento experimental das amostras

Os animais foram identificados pelas letras A,B, C, D, E, F e G. As biópsias foram colhidas durante os atos cirúrgicos, em cinco momentos diferentes durante a fase experimental.

Tempo 1: amostra correspondente ao momento anterior a oclusão dos vasos (controle do próprio animal);

Tempo 2: amostra correspondente a cinco minutos após o início da isquemia;

Tempo 3: amostra correspondente a cinco minutos após o início da reperfusão;

Tempo 4: amostra correspondente a 60 minutos após o início da reperfusão;

Tempo 5: amostra correspondente a 120 minutos após o início da reperfusão.

4.3 Procedimentos cirúrgicos

A preparação dos animais para a cirurgia consistiu, inicialmente, na tricotomia e lavagem do abdômen. Para a dessensibilização da pele para facilitar a introdução transcutânea do catéter foi administrado por via subcutânea, cloridrato de lidocaína (Lidocaína L Pearson ®, Eurofarma, Rio de Janeiro). Um cateter 14 (gauge, 13.3 cm Teflon) foi inserido na veia jugular esquerda dos

eqüinos para administração de drogas anestésicas e fluidos isotônicos. Para evitar a coagulação do sangue no interior do cateter, foi introduzido heparina (Heparin®). Os cascos foram limpos e escovados com água e sabão, a cauda trançada e coberta com atadura de algodão e a boca lavada com água corrente de mangueira. Estes procedimentos visaram evitar a contaminação maior do ambiente cirúrgico. Os animais foram pesados antes da indução anestésica. A anestesia geral foi induzida com xilazina (Calmium®, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo) na dose de 0,5mg/Kg e quetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda/ Divisão Vetbrands Saúde Animal, São Paulo) na dose de 2,2mg/kg, ambos por via endovenosa. Com a sedação satisfatoriamente estabelecida, os animais foram encaminhados para o local de acesso ao centro cirúrgico e foi-se aberto o fluxo de éter gliceril guaiacólico (EGG) (Guaifenesina®, Farnos Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro) endovenoso na dose de 55mg/Kg, sob pressão, sendo mantido até o início de ataxia dos membros posteriores dos eqüinos. Esperou-se então pelo decúbito esternal dos animais e foi-se realizada a entubação orotraqueal, assegurando ventilação mais facilitada em caso de emergência anestésica. A anestesia foi mantida com halotano (Halotano®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo), (1% a 3%) em oxigênio em sistema semi-fechado, com ventilação espontânea. O monitoramento da pressão arterial aconteceu por meio de um manômetro conectado a um cateter na artéria facial. Fluidos poliônicos isotônicos (Solução de Ringer®, Halexistar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) foram administrados via endovenosa em uma média de 5 a 10ml/kg/h com a finalidade da manutenção da pressão arterial acima de 70mm Hg, enquanto os animais eram mantidos em decúbito dorsal. O cloridrato de dobutamina (Neobutamina®, Laboratório Neo Química Comércio e Indústria Ltda, Goiás) na dose de 250mg/kg foi diluído em 500ml de solução glicosada 5% (Halexistar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) e utilizado em um fluxo de uma gota por segundo, sempre que necessário, para auxiliar na manutenção da pressão arterial. Foram conectados, na cauda dos animais: um monitor cardíaco com três eletrodos e a braçadeira de pressão, simultaneamente foi avaliada a taxa de oxigenação sanguínea por meio de um oxímetro. Estes procedimentos permitiram um adequado monitoramento anestésico durante o ato cirúrgico.

Os eqüinos foram posicionados em decúbito dorsal e preparados para a Celiotomia asséptica na linha alba. A incisão de pele cranial à cicatriz umbilical medindo entre 30 a 40cm precedeu a incisão da linha alba e posterior exploração da cavidade abdominal, identificação e exteriorização do ceco. A partir de sua tência dorsal, do ápice em direção à base, o íleo foi identificado próximo à junção íleocecocólica. Procedeu-se a exteriorização do íleo e seguindo-se por dois metros em sentido oral identificou-se a porção distal do jejuno, estabelecendo-se o local para coleta dos fragmentos submetidos à isquemia e reperfusão. Uma área correspondente a 30 centímetros de jejuno, irrigada por uma mesma ramificação da artéria e veia mesentérica foi analisada e colocada sobre um colchão térmico envolvido em um saco plástico esterilizado, com o objetivo de manter o segmento aquecido a uma temperatura em torno de 38°C. O restante do intestino exteriorizado não explorado foi reposicionado para o interior do abdômen. Solução fisiológica 0,9% (Halexstar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) aquecida a 37° C foi aplicada à serosa jejunal para manter a superfície hidratada. A duração da instrumentação foi de aproximadamente uma hora e uma vez instrumentalizados, aguardou-se de 15 a 30 minutos para a estabilização do fluxo sanguíneo jejunal antes da coleta das amostras. Os eqüinos permaneceram anestesiados por mais 180 minutos, no mínimo, durante os períodos de isquemia e reperfusão estabelecidos.

4.4 Modelo experimental

Identificada a área correspondente a 30 centímetros de jejuno, irrigada por uma mesma ramificação da artéria e veia mesentérica, designou-se um segmento controle que correspondesse a todas as camadas da parede intestinal, medindo 5cm de comprimento, o qual foi coletado com auxílio de tesoura *Metzenbaum*. Promoveu-se a sutura, em plano tipo *Chushing*, da região jejunal que sofreu biópsia, com fio *catgut* cromado número zero (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás). O segmento controle foi utilizado para determinar se haveria efeito de edema intestinal durante o tempo de uma hora da instrumentação e anestesia. Outros quatro segmentos intestinais, de mesma dimensão e na mesma área

delimitada previamente, foram designados como experimentais, sendo um avaliado para lesão isquêmica e três avaliados para os tempos determinados de reperfusão tecidual.

Tubos de látex foram posicionados nas extremidades proximais e distais da área jejunal delimitada, ocluindo o lúmen e vasculatura mural, para prevenir circulação colateral. Para o início da indução isquêmica arteriovenosa, foram utilizadas pinças vasculares de *Kocher*, cujas pontas foram recobertas por tubos de látex, para a compressão do conjunto artéria e veia, selecionado e previamente dissecado, sem provocar rompimento dos vasos. A pinça com os tubos de látex transpassaram o mesentério através de pequenos orifícios feitos no mesmo, garantindo a completa indução isquêmica arteriovenosa. Também os vasos de menor calibre, provenientes de ramificações da arcada mesentérica adjacentes, foram ligados com fio *catgut* cromado número zero (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás). Iniciou-se a contagem dos cinco primeiros minutos após a indução isquêmica. A coleta desta segunda amostra foi feita de modo semelhante à coleta do fragmento controle. A isquemia induzida durou mais 55 minutos, completando um total de 60 minutos de isquemia arteriovenosa total. O terceiro fragmento é relativo ao período de indução da reperfusão tecidual, quando foram soltas todas as ligações e suturas dos vasos sanguíneos, a fim de promover a reoxigenação tecidual. A colheita do terceiro fragmento foi realizada no período correspondente a cinco minutos contados a partir do início da indução da reperfusão. O tempo total de reperfusão tecidual considerado no experimento corresponde a duas horas. Logo, outros dois fragmentos de jejuno foram obtidos quando o tempo de reperfusão completou 60 e 120 minutos, respectivamente, o que contabilizou cinco amostras por animal.

A eutanásia dos eqüinos foi realizada enquanto ainda estavam anestesiados, mediante administração intravenosa rápida de 50g de cloreto de potássio PA (Revitec®, Produtos para Laboratórios, São Paulo) diluídos em 100ml de solução fisiológica (Halexlstar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás). Os eqüinos permaneceram conectados ao sistema semi-fechado de anestesia e os parâmetros dos animais foram mensurados através do eletrocardiograma e o óbito pôde ser confirmado pela ausência total de impulsos elétricos.

4.5 Biópsias

Fragmentos com diâmetro total da parede intestinal medindo 2,0 x 5,0cm localizados na borda anti-mesentérica jejunal foram coletados. A variação das amostras foi minimizada através da coleta de fragmentos de mesma localização e padrões idênticos em todos os eqüinos. As amostras foram lavadas em uma solução eletrolítica (Solução de Ringer®, Halexlstar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) e conservadas em formalina tamponada a 10%, para o posterior processamento histopatológico e imunoistoquímico do material.

Os fragmentos fixados em formalina tamponada por 24 horas foram recortados e mantidos em álcool 70% até serem desidratados e incluídos em parafina, assim como cortados na espessura de cinco micrômetros, corados com coloração de rotina hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise, por microscopia óptica de campo claro, das variáveis determinantes das alterações teciduais. Também a partir destes blocos cortaram-se, na mesma espessura, fragmentos que foram preparados para a técnica de imunoistoquímica para a avaliação do perfil de duas proteínas da barreira epitelial intestinal presentes nas junções de aderência (JA) e junções de oclusão (JO), respectivamente, a β -catenina e a ocludina.

4.6 Morfologia qualitativa

Os parâmetros morfológicos qualitativos foram avaliados de acordo com a classificação histológica clássica da camada mucosa, submucosa, muscular e serosa do jejuno. Observaram-se as possíveis presenças de necrose, edema, hemorragias além do desprendimento das células da superfície mucosa da membrana basal e das células adjacentes. Para tal, foram utilizados escores variando de zero a três, conforme demonstrado abaixo no Quadro 1.

QUADRO 1 - Escores aplicados as diversas alterações na mucosa jejunal

ALTERAÇÕES	ESCORE
Ausência	-
Discreta	+
Moderada	++
Acentuada	+++

As graduações foram definidas de acordo com lesões iniciais de degeneração, necrose e desprendimento de células presentes na porção apical das vilosidades com progressivo comprometimento da porção basal e de criptas. As variáveis relativas á hemorragia e infiltração leucocitária foram avaliadas visualmente pelo aumento da população destas células no meio intersticial quando comparadas ao segmento controle determinado para cada animal, levando-se em consideração, desta maneira a diversidade amostral e focando-se individualmente no fato de que cada animal submetido aos tratamentos é também seu próprio controle.

4.7 Imunoistoquímica

As lâminas utilizadas para a imunoistoquímica foram previamente preparadas com organosilano (3-aminopropyl triethoxysilane, Sigma Inc., Missouri) para uma melhor aderência do tecido à superfície da lâmina. Cada lâmina continha dois cortes teciduais, um que recebeu todos os tratamentos da técnica de imunoistoquímica, considerado positivo, e outro que recebeu um tampão fosfato (PBS) em substituição ao anticorpo primário. O protocolo abaixo descreve as etapas de imunoistoquímica para a verificação das proteínas β -catenina e ocludina:

- Escorrer parafina em estufa a 56°C por 20 minutos em média;
- Reidratação do material: bateria do xilol para graduações decrescentes de álcool 100% a 70% e água destilada;
- Bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio por 15 minutos;

- Recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (2,4 g citrato de sódio em um litro de água destilada) em panela de pressão por 5 minutos contados a partir da emissão do som decorrente ao aumento da pressão interna da panela;
- Marcação dos pocinhos correspondentes às áreas teciduais com caneta hidrofóbica (Liquid Blocker – Super Pap Pen) e lavagem do tecido com PBS;
- Bloqueio de ligações inespecíficas com albumina bovina sérica (BSA) 3%
- Incubação com anticorpo primário policlonal anti- β catenina produzido em camundongos (Cell Signalling Technology, Inc., Massachusetts, EUA), que reconhece as porções intracitoplasmáticas da E-caderina e outras caderinas clássicas presentes na mucosa jejunal, na diluição de 1:1000 em BSA 1,5% e deixado em câmara úmida na geladeira por aproximadamente 16 horas (apenas os cortes positivos, aqui os negativos recebem PBS) para a proteína Ocludina usou-se anticorpo primário policlonal anti-occludina produzido em cabras (Cell Signalling Technology, Inc., Massachusetts, EUA), que reconhece as mesmas nas áreas da barreira epitelial condizentes às JT, na diluição de 1:1000 em BSA 1,5% e deixado em câmara úmida na geladeira por aproximadamente 16 horas (apenas os cortes positivos, aqui os negativos recebem PBS);
- Incubação do kit LSAB que já possui anticorpos secundários anti-camundngos, anti-cabra e anti-coelho
- Revelação utilizando substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidine – DAB (Dako Colorado, Inc., Colorado) por três minutos;
- Contracoloração com hematoxilina de Harris (30 segundos);
- Lavagem em água destilada;
- Desidratação em série crescente de graduações alcoólicas (70% a 100%);
- Montagem das lâminas com entellan (Merck, Darmstadt) e lamínula.

Os cortes de epitélio da mucosa jejunal, positivamente marcados para β -catenina e Ocludina, foram analisados por microscopia óptica utilizando-se de objetivas com aumentos de 40 e 100 vezes. As áreas marcadas em cada corte

positivo foram comparadas ao seu controle negativo correspondente. A ausência de marcação no corte negativo foi utilizada na comprovação da ligação do anticorpo primário nas áreas marcadas do corte positivo correspondente.

Para a realização da morfometria colorimétrica foi utilizado o software *Image J*, que avalia semi-quantitativamente os resultados, mensurando a intensidade das marcações da β -catenina e Ocludina na mucosa intestinal do segmento controle e dos segmentos tratados de cada um dos animais e convertendo esta intensidade de cor em números naturais. Oito campos de cada lâmina observados em objetiva de 40 vezes foram fotografados para avaliação morfométrica. Para obtenção deste número de campos por lâminas avaliadas utilizou-se o cálculo da média da área acumulada. Para classificação dos resultados obtidos em escores, o critério utilizado, condizente à expressão da proteína, baseou-se na diminuição da cor em até um terço do valor numérico obtido pela conversão da intensidade da cor da expressão protéica do segmento controle (fortemente expressada), dois terços da expressão do segmento controle (moderadamente expressada) e menos do que dois terços do segmento controle (fracamente expressada). Isto é, as expressões das proteínas em questão sempre eram consideradas fortes nos segmentos controle, independente da variação entre os animais e a diminuição da expressão, traduzida numericamente pelo software, variava entre moderada e fraca quando comparada ao seu respectivo controle na proporção de um terço e dois terços, respectivamente.

4.8 Análise Estatística

O teste para avaliação não paramétrica de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn) (SAMPAIO, 1998), com nível de segurança de cinco por cento ($P < 0,05$), foi aplicado para verificar a presença de diferença significativa para o método de imunistoquímica da camada epitelial longitudinal da mucosa jejunal para ambos os anticorpos em análise. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado sobre os dados brutos obtidos pela avaliação morfocolorimétrica em oito campos por tratamento, por animal, com o objetivo de comparar os valores obtidos entre os tratamentos de cada animal. Desta forma, cada animal obteve uma análise estatística

individualizada, levando em consideração apenas a variação individual na expressão da proteína em questão dentro dos tempos aplicados nos tratamentos. A opção por esta análise deve-se ao fato de as amostras animais serem diferentes entre si no que se diz respeito à idade, sexo, alimentação recebida e trabalho realizado ao longo da vida, o que inviabiliza a realização de uma estatística paramétrica que compararia os resultados obtidos entre os animais. Entretanto, para a determinação do escores aplicados a expressão das proteínas (fortemente, moderadamente e fracamente expressadas), foram utilizadas as médias dos valores brutos, utilizados no teste de Kruskal-Wallis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos microscópicos qualitativos pela coloração Hematoxilina e Eosina

As alterações de edema e hemorragia observadas nas camadas intestinais do segmento controle do animal “A” foram evidenciadas microscopicamente pelo significativo aumento no volume da lâmina própria, da submucosa e serosa intestinal deste animal, todas apresentaram vasos sanguíneos leve a moderadamente congestos e leve infiltração polimorfonuclear por neutrófilos e eosinófilos. Os demais segmentos controle apresentaram apenas leves alterações edematosas na túnica submucosa.

O edema da amostra jejunal controle do animal “A” é descrito tanto macro quanto microscopicamente como uma característica comum na lesão intestinal por isquemia e reperfusão. O edema é um acúmulo de fluido intersticial e pode ser resultado de obstrução linfática, pressão hidrostática e oncótica desbalanceada a nível capilar ou alterações na permeabilidade capilar. Um leve aumento do volume da camada submucosa foi observado nos segmentos controles de todos os animais, contudo, era de todo esperado, porque conforme descrito em estudos anteriores em eqüinos, o edema de submucosa é atribuído à manipulação tecidual e inflamação peritoneal oriunda de uma cavidade abdominal aberta durante a realização do estudo (DABAREINER et al., 1995).

5.1.1 Alterações em túnicas jejunais

Comparativamente aos segmentos controles, que não demonstraram alterações histopatológicas dignas de nota nas camadas que compõe o jejuno, todos os segmentos intestinais relativos ao Tempo 2, que indicam o período de isquemia arteriovenosa de cinco minutos, demonstraram alterações degenerativas difusas e moderadas dos enterócitos, com características citoplasmáticas de tumefação, aumento da granulação e da eosinofilia.

Alterações nucleares focais foram observadas em todos os animais com predominância da condensação nuclear no tempo de isquemia e das demais características de necrose em grau leve. As vilosidades intestinais também foram focalmente e progressivamente acometidas pelas mesmas lesões degenerativas e

necróticas nos tempo de reperfusão em graus que variaram entre o moderado e o acentuado, em todos os animais conforme demonstrado nos Quadros 4, 5 e 6.

Também foi observada eosinofilia acentuada difusa e leve perda focal das microvilosidades, onde se localizam as dissacaridases e dipeptidases responsáveis pela digestão terminal das proteínas e glicídeos, normalmente visualizadas como uma delicada cutícula eosinofílica na região apical dos enterócitos, no momento de isquemia, em todos os animais, com progressiva destruição difusa das mesmas nos tempos de reperfusão.

O aumento do fluxo sanguíneo na mucosa durante cinco minutos de reperfusão, neste estudo, indica que o fluxo sanguíneo na mucosa aparentemente parece retornar adequadamente após isquemia e reperfusão arteriovenosa completa. Apesar do retorno do fluxo sanguíneo intestinal, a necrose na mucosa piora significativamente durante a reperfusão, sugerindo que a mensuração do retorno do fluxo sanguíneo intestinal após correção cirúrgica de isquemia naturalmente adquirida poderia, potencialmente, resultar em efeito deletério da viabilidade intestinal e da sobrevivência do animal (MOORE, 1995).

QUADRO 2 - Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo ao controle

Variável	Avaliação	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1
Alterações celulares: Degeneração e necrose	Citoplasma	-	-	-	-	-	-	-
	Núcleo	-	-	-	-	-	-	-
Acúmulo de líquido Subepitelial		-	-	-	-	-	-	-
Acúmulo de células Inflamatórias (CI) e debris celulares (DE)	CI	++	-	-	-	-	-	-
	DC	-	-	-	-	-	-	-
Alterações em criptas	Colapso	-	-	-	-	-	-	-
	Separação por edema	+	-	-	-	-	-	-
	Separação por hemorragia	+	-	-	-	-	-	-
Escore Total		02	0	0	0	0	0	0
<p>Legenda: (0) zero = a ausência total de alterações; (+) = alterações leves; (++) = alterações moderadas; (+++) = alterações severas.</p> <p>Média aritmética dos escores obtidos pela soma referente aos fragmento intestinais correspondentes ao tempo relativo ao controle = 0,29</p>								

QUADRO 3 - Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo de isquemia artério-venosa completa de cinco minutos

Variável	Avaliação	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2
Alterações celulares: degeneração e necrose	Citoplasma	++	++	++	++	++	++	++
	Núcleo	+	+	+	+	+	+	+
Acúmulo de líquido subepitelial		++	++	+	++	++	++	++
Acúmulo de células inflamatórias e debris celulares	CI	++	++	++	++	++	++	+
	DC	+	-	-	-	+	+	-
Alterações nas criptas	Colapso	-	-	-	-	-	-	-
	Separação por edema	+	+	+	+	+	+	+
	Separação por hemorragia	+	+	+	+	+	+	+
Escore Total		10	09	08	09	10	10	08
<p>Legenda: (0) zero = a ausência total de alterações; (+) = alterações leves; (++) = alterações moderadas; (+++) = alterações severas.</p> <p>Média aritmética dos escores obtidos pela soma referente aos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo de isquemia arteriovenosa completa de cinco minutos</p> <p>= 9,15</p>								

QUADRO 4 - Morfologia Qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a cinco minutos de reperfusão completa

Variável	Avaliação	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3
Alterações celulares: degeneração e necrose	Citoplasma	++	++	++	++	++	++	++
	Núcleo	++	++	++	++	++	++	++
Acúmulo de líquido subepitelial		++	++	++	++	++	++	++
Acúmulo de células inflamatórias e debris celulares	CI	+++	++	++	++	+++	+++	++
	D C	++	+	+	++	++	++	++
Alterações nas criptas	Colapso	+	+	-	-	+	+	-
	Separação por edema	++	+	++	+	++	++	+
	Separação por hemorragia	+	+	+	+	+	+	+
Escore Total		15	12	12	12	15	15	12
<p>Legenda: (0) zero = a ausência total de alterações; (+) = alterações leves; (++) = alterações moderadas; (+++) = alterações severas.</p> <p>Média aritmética dos escores obtidos pela soma referente aos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a cinco minutos de reperfusão completa</p> <p>= 13,3</p>								

QUADRO 5 - Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a 60 minutos de reperfusão completa

Variável	Avaliação	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4
Alterações celulares:	Citoplasma	++	++	++	++	++	++	++
Degeneração e necrose	Núcleo	+++	++	++	++	+++	++	++
Acúmulo de líquido subepitelial		++	++	++	++	++	++	++
Acúmulo de células inflamatórias e debris celulares	C I	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
	DC	++	++	++	++	++	++	+
Alterações nas criptas	Colapso	+	+	+	+	+	+	+
	Separação por edema	++	++	++	++	++	++	++
	Separação por hemorragia	+	+	+	++	+	+	+
Escore Total		16	14	14	14	16	15	14
<p>Legenda: (0) zero = a ausência total de alterações; (+) = alterações leves; (++) = alterações moderadas; (+++) = alterações severas.</p> <p>Média aritmética dos escores obtidos pela soma referente aos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a 60 minutos de reperfusão completa</p> <p>= 14,8</p>								

QUADRO 6 - Morfologia qualitativa para coloração de hematoxilina e eosina dos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a 120 minutos de reperfusão completa

Variável	Avaliação	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5
Alterações celulares: Degeneração e necrose	Citoplasma	++	++	++	++	++	++	++
	Núcleo	+++	+++	++	++	+++	+++	++
Acúmulo de líquido subepitelial		++	++	++	++	++	++	++
Acúmulo de células inflamatórias e debris celulares	CI	+++	++	++	++	+++	+++	++
	DC	++	++	++	++	++	++	++
Alterações nas criptas	Colapso	+	+	+	+	+	+	+
	Separação por edema	+++	++	++	++	+++	+++	++
	Separação por hemorragia	+	+	+	+	++	+	+
Escore Total		17	17	14	14	17	17	14
<p>Legenda: (0) zero = a ausência total de alterações; (+) = alterações leves; (++) = alterações moderadas; (+++) = alterações severas.</p> <p>Média aritmética dos escores obtidos pela soma referente aos fragmentos intestinais correspondentes ao tempo relativo a 120 minutos de reperfusão completa = 15,7</p>								

A progressão da necrose pôde ser vista nos Tempos 3, 4 e 5, respectivamente relativos à reperfusão de cinco, 60 e 120 minutos, quando grupos de enterócitos, após desenvolverem necrose celular, desprenderam-se da membrana basal e células vizinhas, no topo do vilô.

As lesões induzidas experimentalmente no presente experimento, criadas por oclusão arteriovenosa completa seguida por reperfusão, foram similares às lesões adquiridas naturalmente, tanto no período de isquemia quanto no agravamento das lesões observado nos tempos de reperfusão. DABAREINER et al., (1995) descreveu as lesões que se desenvolvem naturalmente durante obstruções estrangulativas no intestino delgado de eqüinos como edema, extravasamento de eritrócitos, infiltração leucocitária, perda de células epiteliais da mucosa, congestão capilar e perda de células mesoteliais, além da diminuição da área superficial da mucosa e do seu volume.

Desta forma, as lesões características da indução experimental de isquemia apresentada em um período de 5 minutos e mantida por mais 55 minutos, no presente trabalho, foram condizentes com lesões degenerativas difusas moderadas e de necrose epitelial de severidade leve, porém progressiva. MOORE et al., (1995) avaliou os efeitos da isquemia sobre o epitélio jejunal de forma que o mesmo apresentou-se completamente desnudo de seu epitélio em três horas de isquemia, com contração do vilô em direção às criptas. Necrose completa do epitélio da mucosa jejunal estendendo-se para a base das criptas ocorreu entre quatro a cinco horas e, entre seis a sete horas a degeneração já progrediu em direção às camadas musculares.

Durante a isquemia, a altura das vilosidades permaneceu semelhante à observada no segmento controle, apesar das alterações nucleares focais observadas em todos os animais, com predominância da condensação nuclear no tempo de isquemia. Assim, sugere-se que ainda nesta fase da injúria celular e tecidual, os animais poderiam ter suas funções entéricas recuperadas, caso o estímulo incitante da isquemia fosse abolido, pois conforme descrito por MOORE et al. (1995), se os eqüinos sobreviverem ao período de necrose inicial da mucosa e desprendimento celular e, se existirem enterócitos viáveis presentes, a mucosa pode regenerar-se por meio da migração destas células e será recoberto por epitélio

entre 12 a 24 horas.

Entretanto, os eqüinos utilizados no presente trabalho foram submetidos á eutanásia após a coleta dos fragmentos jejunais e, desta forma, não foram observados e examinados em um período pós-operatório de modo a terem um prognóstico preciso sobre sua recuperação.

FALEIROS (2000) descreve que apesar da reepitelização (em 12 horas) da mucosa jejunal de eqüinos submetidos à isquemia jejunal por um período de até três horas, complicações posteriores poderiam aparecer tais como: fibroses, estenoses, abscessos, aderências e ulceração de mucosas. MOORE et al. (1995) explicam ainda que, a progressão da injúria epitelial da mucosa jejunal pode levar a necrose completa da mucosa com ruptura da barreira epitelial permitindo a migração de bactérias e endotoxinas lúminais para a circulação resultando em endotoxemia. Adicionalmente, o seqüestro de grandes quantidades de fluido na parede, lúmen e mesentério intestinal resulta em hipovolemia.

Durante obstrução estrangulativa (obstrução luminal e vascular simultaneamente) hemorrágica ou isquêmica, fluido é seqüestrado no espaço subepitelial e o epitélio começa a desprender-se da sua membrana basal no ápice das vilosidades. Observou-se focalmente no topo das vilosidades jejunais separação leve a moderada do epitélio e da sua camada adjacente, no tempo de isquemia em todos os animais. Notou-se ainda, leve progressão da lesão deste local em direção às criptas, de modo focal a difuso, nos tempo de reperfusão, não apresentando diferenças significativas nos graus de severidade da lesão. É oportuno salientar que algumas células epiteliais descamaram-se, unidas em lâminas, antes de desenvolverem alterações intracelulares severas.

Congestão de capilares e aumento no diâmetro dos vasos lacteais da submucosa também foram evidentes em todos os animais, a partir do início da indução isquêmica, persistindo em diferentes proporções durante os tempos de reperfusão também em todos os animais (Figura 5).

Infiltração neutrofílica ocorreu na lâmina própria, submucosa e serosa jejunais. No tempo relativo à isquemia, a infiltração apresentou-se discreta a moderada e de modo predominantemente focal entre a lâmina própria, muscular da mucosa e a submucosa, acentuando-se de modo semelhante nos três tempos de reperfusão em todos os animais, como demonstrado nos Quadros 2 a 6 e na Figura

5. Notou-se um discreto aumento do número de eosinófilos no período de isquemia, que se manteve estável também nos tempos de reperfusão aferidos. Igualmente, no período de isquemia observou-se discreto aumento no número de macrófagos, e no período de reperfusão estas células aumentaram moderadamente e permaneceram estáveis.

Segundo DABAREINER et al. (1995); FALEIROS (2000); CONTRAN et al. (2000); JONES² et al. (2000), a infiltração leve a moderada de células inflamatórias no intestino está proporcionalmente condizente às lesões celulares e teciduais, podendo, entre outros fatores nocivos, tais como, liberação de substâncias químicas deletérias pelas células endoteliais lesadas, justificar os principais achados de degeneração epitelial, uma vez que estas células inflamatórias também provocam danos em células do tecido.

Ainda segundo DABAREINER et al. (1995), normalmente, poucos neutrófilos são encontrados no interstício do intestino delgado de eqüinos clinicamente saudáveis, porém estas células realmente acumulam-se na parede deste segmento intestinal subsequente à isquemia e reperfusão. Os neutrófilos intersticiais são os leucócitos predominantemente responsáveis pela mediação da injúria na mucosa associada à isquemia e reperfusão em animais de laboratório, porém quando presentes na vasculatura podem apresentar efeitos deletérios na mucosa secundários às injúrias microvasculares. Os neutrófilos acumulam-se nas paredes do intestino delgado de eqüinos naturalmente acometidos por obstruções intestinais e isquemia e também naqueles conduzidos a isquemia e reperfusão experimentais. Adicionalmente, a população relativamente grande de eosinófilos na lâmina própria da mucosa e submucosa pode contribuir para a injúria na mucosa.

No período de isquemia, raros debris celulares foram detectados no lúmen intestinal em todos os animais. Os tempos de reperfusão já apresentaram um aumento progressivo de debris celulares, oriundos do desacoplamento da camada epitelial de sua membrana basal adjacente com exposição e extravasamento dos elementos que compõem a lâmina própria em graus que variaram entre leve a moderado, porém, sem o comprometimento da arquitetura normal da camada mucosa. As células epiteliais desprendidas da lâmina basal encontravam-se sob a forma de folhetos de células epiteliais.

O colapso das criptas caracterizou-se pela progressão das alterações

degenerativas nas células epiteliais mucosas, com extensão de necrose do topo das vilosidades para o nível de criptas. Essas se encontravam focalmente colapsadas apenas a partir do tempo de reperfusão em todos os animais e em graus variáveis de severidade. O espaço entre as criptas jejunais tornou-se difusamente maior no tempo de isquemia, agravando-se nos períodos de reperfusão devido ao severo acúmulo de líquido do edema e da diminuição do número de células e, conseqüentemente, do tamanho e profundidade das criptas (Figura 5). Discreta hemorragia foi observada na lâmina própria dos animais que sofreram isquemia, que se acentuou progressivamente nos tempos de reperfusão.

Apesar de não terem sido avaliados no presente trabalho, os mecanismos biomoleculares vasculares que levaram ao quadro de edema e hemorragia observados, MOORE, (1997) semelhantemente a DABAREINER et al. (1995), o fizeram ao descreverem em seus trabalhos que as células endoteliais dos capilares subepiteliais apresentavam-se distendidas, com ruptura das junções de oclusão endoteliais resultando em dispersão de eritrócitos e neutrófilos, confirmando a patogênese e agravamento da lesão isquêmica tanto por ação das próprias células endoteliais lesionadas como por intermédio do infiltrado celular e liberação de seus conteúdos tóxicos.

A análise histopatológica qualitativa confirmou o agravamento da lesão da isquemia frente à reperfusão tecidual. Todos os aspectos avaliados individualmente tais como alterações de células da mucosa, acúmulo de líquido subepitelial, alterações na submucosa, infiltração inflamatória, entre outros, foram predominantemente classificados em grau moderado, sugerindo que a restauração do fluxo sanguíneo após a isquemia exacerbou a lesão na mucosa. Entretanto, se a lesão por reperfusão não tivesse ocorrido, poderia se esperar uma injúria de mucosa igual ou maior com três a sete horas de isquemia sem reperfusão, como descrito por MOORE et al. (1994).

É conhecimento corrente que as vilosidades intestinais com lesões degenerativas e necróticas, a eosinofilia das microvilosidades, a progressão da necrose e o acúmulo de líquido subepitelial são reações a efeitos primários da reperfusão. Atribui-se à ação direta de radicais livres o aumento da permeabilidade vascular e estimulação de macrófagos, peroxidação de lipídeos, lesão das membranas celulares e alterações na estrutura de DNA (DROY-LEFAIX et al., 1991;

MOORE et al. 1995; MOORE, 1999; PEREIRA, 1999; COTRAN et al. 2000; JONES² et al. 2000; FALEIROS, 2000).

A lesão das membranas celulares, principalmente do endotélio vascular, e a estimulação de macrófagos são responsáveis pela liberação de substâncias que causam migração e ativação destes neutrófilos, que agora são responsáveis por uma nova produção de radicais livres e agravamento das lesões celulares e teciduais (FALEIROS, 2000). Tal agravamento pode justificar o colapso das criptas das células epiteliais mucosas com extensão de necrose a partir do topo das vilosidades.

As principais alterações observadas na submucosa jejunal dos eqüinos em estudo foram o acentuado edema, com notável aumento na área desta camada intestinal em comparação à maioria dos fragmentos controle nos períodos de isquemia e todos os períodos de reperfusão, e severa congestão de vasos sanguíneos durante a isquemia com notável aumento em diâmetro dos mesmos (Figura 5). Áreas de hemorragia focal foram observadas principalmente no tempo da isquemia, em todas as amostras, caracterizadas por extravasamento de eritrócitos de modo a comprometer a arquitetura tecidual das regiões onde ocorria em alguns casos. Um elevado número de células inflamatórias, principalmente eosinófilos e neutrófilos, infiltravam a camada submucosa oriundos da circulação sanguínea. Outros leucócitos também foram observados em menores proporções nas amostras, com predominância de macrófagos contendo hemossiderina, além de linfócitos e plasmócitos.

No tempo de isquemia, o edema apresentado na serosa do animal "A" evidenciou-se, aumentando ainda mais a área de tecido conjuntivo nesta camada. Os demais animais apresentaram, sem exceção, edema classificado entre discreto a moderado, assim como congestão dos vasos sanguíneos na túnica serosa, além de infiltração eosinofílica e neutrofílica leve.

A partir da liberação do fluxo sanguíneo, nos fragmentos condizentes ao Tempo 3, o edema progrediu levemente nos animais e os vasos sanguíneos mostraram-se ligeiramente mais repletos de sangue e de diâmetro maior. A infiltração por células polimorfonucleares não mostrou diferença entre o tempo de isquemia e nos cinco primeiros minutos de reperfusão em nenhum das amostras. A camada mesotelial mostrou-se íntegra em alguns animais durante a isquemia e

enquanto em outros apresentou leves falhas de descontinuidade.

Nos Tempos 4 e 5, o edema observado foi mais grave quando comparado aos Tempos 2 e 3. Semelhantemente, os vasos sanguíneos apresentaram-se congestionados e o infiltrado inflamatório foi de caráter moderado (Figura 5).

De modo geral, as túnicas que constituem a parede jejunal mostraram alterações circulatórias e inflamatórias como congestão e edema com infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear, principalmente na túnica submucosa, mas também significativas na túnica muscular própria. HENNINGER et al. (1992) utilizando o método do coeficiente de reflexão osmótico, demonstrou que estas alterações são conseqüentes à alteração da permeabilidade microvascular. Porém, estas alterações podem ser confirmadas sem o emprego deste método, uma vez que a severidade do edema e da hemorragia, especialmente na túnica submucosa, no período de reperfusão mostrou-se acentuada.

De acordo com MOORE (1999) e FALEIROS (2000) o aumento da severidade da lesão nestas variáveis pode ainda ser resultante do aumento da pressão hidrostática capilar ou diminuição da pressão oncótica capilar. Por estas razões, acredita-se que o aumento dos índices de edema e hemorragia observados nestas camadas citadas e também na mucosa, seja indicativo do aumento da permeabilidade microvascular em associação à lesão por isquemia e reperfusão, podendo estar envolvido o mecanismo de formação de edema por meio da estase venosa, durante a isquemia.

A lesão por isquemia e reperfusão tem sido atribuída à necrose celular, no entanto, recentes pesquisas implicam outro distinto tipo morfológico e bioquímico de morte celular após isquemia e reperfusão, apoptose. Células apoptóticas na mucosa, camada muscular circular e longitudinal e na serosa foram recentemente identificados em casos clínicos de obstrução estrangulativa intestinal em eqüinos (ROWE & WHITE, 2002), apesar de não terem sido avaliadas no presente experimento.

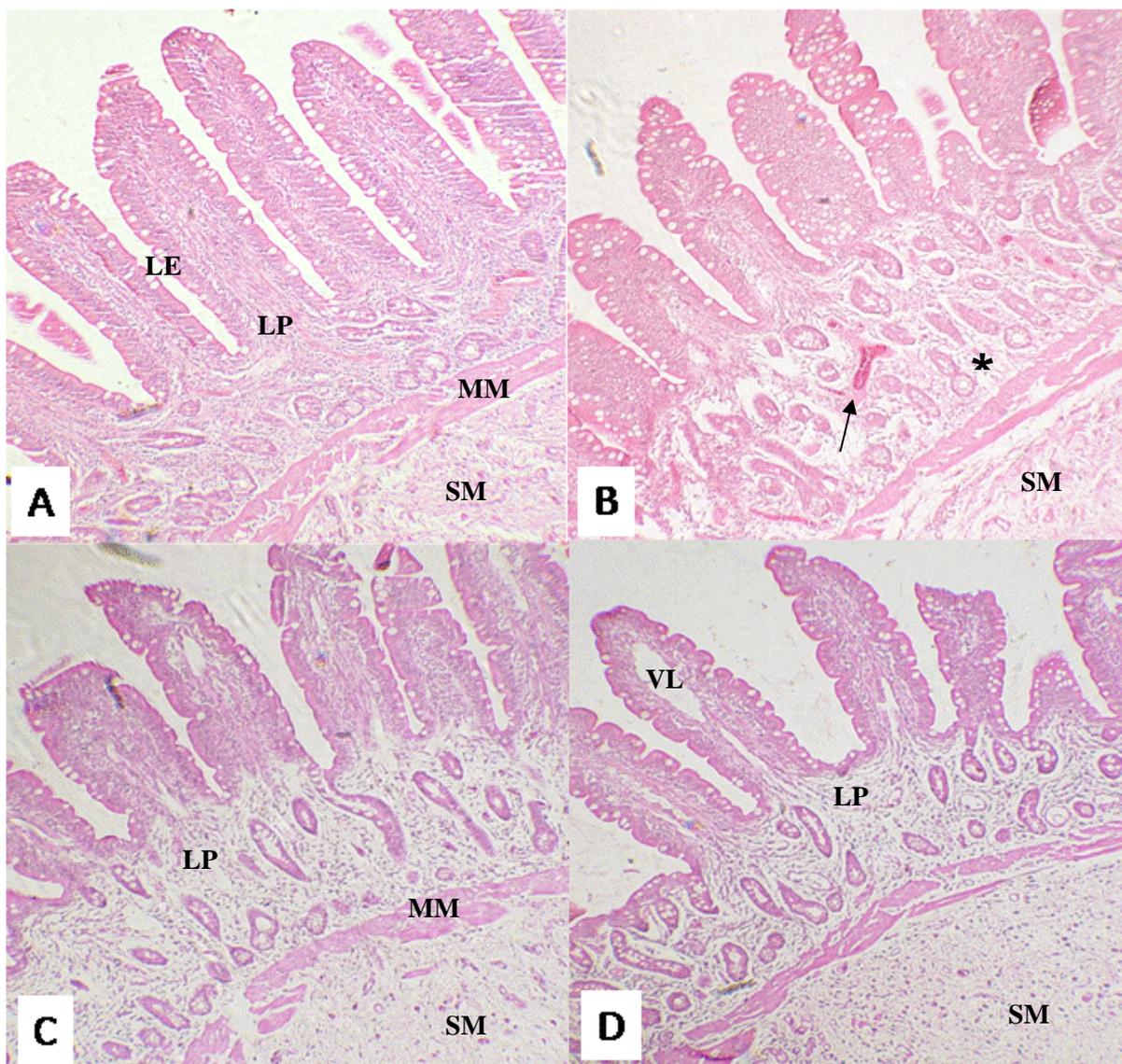


FIGURA 05 – Fotomicrografia de intestino delgado de equino evidenciando progressão do edema nos períodos de isquemia e reperfusão. (A) Aspecto normal de túnica mucosa intestinal e suas lâminas epitelial (LE), própria (LP) e muscular da mucosa (MM). Abaixo Túnica submucosa (SM). Animal D1. (H&E Aumento de 25x). (B) Lâmina própria apresentando vasos congestionados (seta) e edema que leva ao leve aumento do volume da lâmina própria (asterisco). Observar edema na Túnica Submucosa (SM). Tempo 2. Animal D. (H&E 25x). (C) Edema da Lâmina própria (LP), moderado afastamento entre criptas e diminuição do comprimento das mesmas. Abaixo Muscular da mucosa (Mm) e Submucosa (SM) também apresentando edema moderado. Animal D4. (H&E 25x). (D) Edema da lâmina própria (LP) evidenciando aumento do diâmetro de vaso lacteal (VL) em vilosidade intestinal, afastamento entre criptas e acentuado edema na submucosa (SM). Animal (D5). (H&E 25X).

5.2 Avaliações das expressões das proteínas β -catenina e ocludina

A camada epitelial jejunal foi avaliada para ambos os anticorpos policlonais anti- β -catenina e anti-occludina nas amostras coletadas para o tempo controle, de isquemia arteriovenosa de cinco minutos e de reperfusão de cinco, 60 e 120 minutos.

A Tabela 2 resume as médias dos valores brutos obtidos pela morfometria colorimétrica conforme o tempo da obtenção da amostra para os fragmentos avaliados para mensuração da β -catenina e a Tabela 10 resume as médias dos dados brutos conforme o tratamento aplicado às amostras para a avaliação da expressão da Ocludina no epitélio jejunal. A avaliação destas tabelas permite a compreensão do cálculo utilizado para a aplicação dos escores na classificação da intensidade das proteínas, descritos no capítulo de materiais e métodos.

Para FALEIROS (2000), a exposição das células intestinais aos tratamentos de isquemia e reperfusão determina um significativo impacto na respiração mitocondrial, tal disfunção está associada à redução da aderência celular, assim como às alterações das proteínas das JO. Isso pôde ser evidenciado nos resultados imunoistoquímicos, do presente experimento, por meio do estabelecimento de escores de intensidade da expressão das proteínas em questão, em cada um dos tempos mensurados.

5.2.1 Análise imunoistoquímica

a) Localização e expressão da β -catenina

Em todas as amostras estudadas, a β -catenina foi encontrada em marcação intracitoplasmática, próxima à membrana celular, de distribuição heterogênea, tanto nas criptas quanto nas vilosidades intestinais, conforme demonstrado na Figura 6. No entanto, alguns grupos de células nos vilos, assim como alguns grupos de células localizados imediatamente após a zona de transição das criptas e vilos, não apresentaram níveis detectáveis de β -catenina.

Em todas as outras partes do epitélio intestinal a coloração era fortemente expressada e concentrada na região da membrana celular.

A expressão diminuída da β -catenina em todos os animais, ainda que com intensidades diferentes, indica a tendência da injúria da mucosa intestinal que acomete inicialmente o topo das vilosidades e segue em direção às criptas e camadas mais profundas, pela perda progressiva da adesividade intercelular (Figura 6).

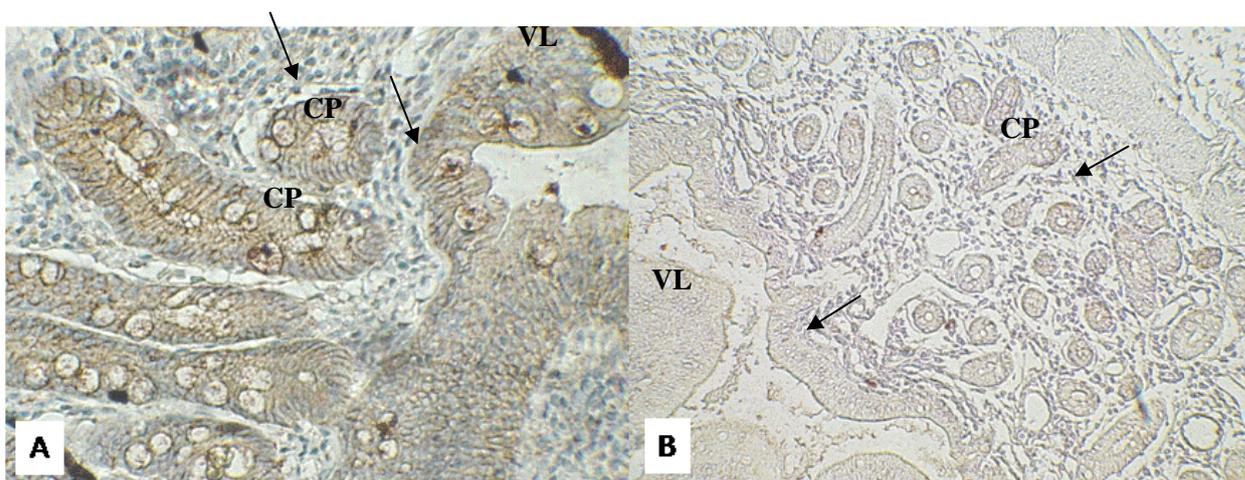


FIGURA 6 - Fotomicrografias representativas da marcação com anticorpo anti- β -catenina em cortes de intestino delgado de eqüinos submetidos á isquemia e reperfusão. (A) Forte expressão da proteína β -catenina no epitélio das vilosidades (VL) e criptas jejunais (CP) no Tempo 1 (setas). Animal B1 (Aumento de 100 x). (B) Fraca expressão da proteína β -catenina no epitélio das vilosidades (EP) e criptas jejunais (CP) no Tempo 5 (setas). Animal B5. (Aumento de 100x).

A Tabela 1 demonstra as comparações entre o tempo controle e os tratamentos aplicados no animal A. Resultados estatisticamente significantes ($P < 0,001$) foram encontrados nas comparações dos dados brutos do segmento controle em relação ao tempo de reperfusão de 120 minutos, assim como quando o tempo de isquemia foi comparado ao mesmo tempo de reperfusão de 120 minutos, indicando o agravamento da lesão por reperfusão, principalmente aos 120 minutos após o início da mesma frente á lesão isquêmica, neste animal. Resultados de menor significância estatística ($P < 0,01$) ainda foram encontrados

nas comparações dos tempos controle e reperfusão de 60 minutos e entre a isquemia e a reperfusão de 60 minutos, o que sugere que o agravamento da lesão por reperfusão em relação à isquemia já tenha início aos 60 minutos de reperfusão tecidual, ainda que de maneira menos significativa. A Figura 7 reflete a curva obtida através do cálculo das médias dos valores brutos de cada tratamento para o Animal A. Nota-se a tendência da diminuição da expressão da proteína ao longo dos tratamentos. Especificamente neste animal a expressão da β -catenina foi fortemente demonstrada no tempo controle e também durante a lesão isquêmica, enquanto que, apenas a partir da restituição da perfusão sanguínea, em cinco e 60 minutos, a expressão foi moderada. Com duas horas de reperfusão a expressão mostrou-se fraca.

Semelhantemente, a Tabela 3 demonstra diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os tempos T1 e T5 e entre T2 e T5 do animal B. Os demais tratamentos quando comparados entre si não apresentaram valores que indiquem significância. Isso sugere uma homogeneidade maior na diminuição da expressão da proteína ao longo dos tratamentos de reperfusão, em comparação à isquemia, que apenas tornou-se significativa ao alcançar os 120 minutos de reperfusão tecidual. O gráfico da Figura 8 mostra que a expressão da proteína no animal B tornou-se moderada já no tempo de isquemia e a reperfusão pareceu agravar a tendência na diminuição da expressão e fraca expressão da proteína nos tempos de cinco, 60 e 120 minutos pós-reperfusão.

TABELA 1 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunohistoquímica da Beta Catenina para o Animal A (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	0.2500	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	12.125	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T4	20.125	98,5	** P<0.01
T1 vs. T5	28.125	98,5	*** P<0,001
T2 vs. T3	11.875	98,5	ns P>0,05
T2 vs. T4	19.875	98,5	** P<0.01
T2 vs. T5	27.875	98,5	*** P<0.001
T3 vs. T4	8.000	98,5	ns P>0,05
T3 vs. T5	16.000	98,5	ns P>0,05
T4 vs. T5	8.000	98,5	ns P>0,05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

TABELA 2 – Médias dos valores absolutos (n=8) individuais obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunohistoquímica da Beta Catenina para os Animais de A a G nos tempos de 1 a 5.

TEMPO	ANIMAL						
	A	B	C	D	E	F	G
1	14,44	23,17	24,95	17,56	17,53	20,87	18,69
2	8,13	19,73	9,44	11,56	8,47	14,09	17,80
3	3,60	5,21	6,88	10,48	6,19	14,97	9,22
4	3,95	5,53	6,88	7,93	3,41	14,55	15,48
5	3,18	5,15	6,73	9,09	2,64	11,98	3,92

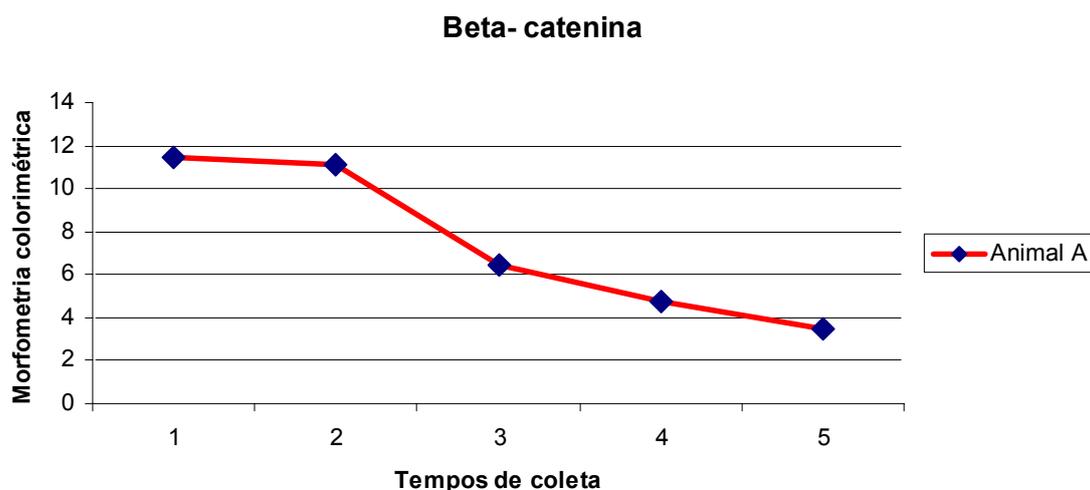


FIGURA 7 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal A nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

TABELA 3 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal B (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (H)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	16.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T4	24.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T5	32.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	8.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	16.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	24.000	98,5	*** P<0.001
T3 vs. T4	8.000	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	16.000	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	8.000	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

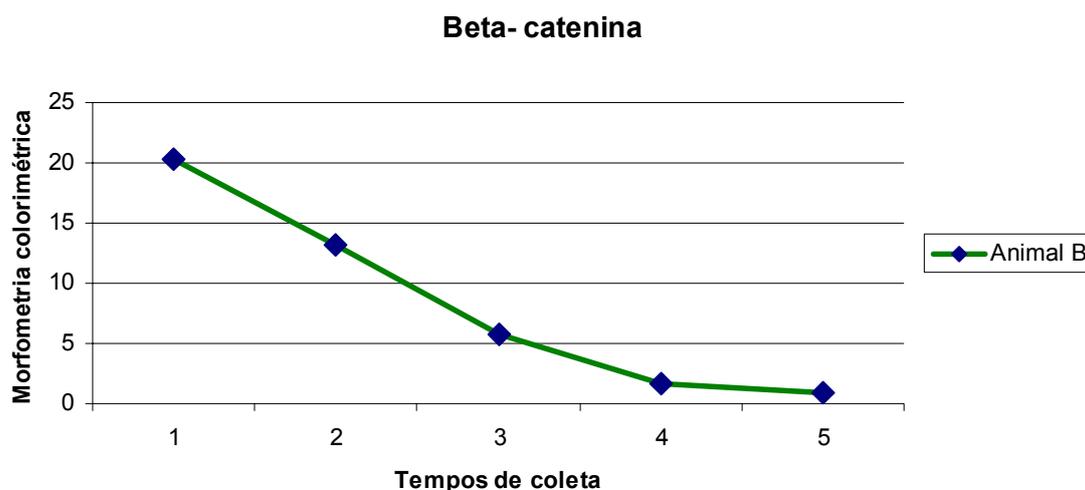


FIGURA 8 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal B nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Os resultados estatísticos apresentados na Tabela 4 apontam extrema significância ($P < 0,001$) quando são comparados os tempos de controle e reperfusão de cinco minutos em comparação dos tempo de controle e de reperfusão de 60 minutos para o animal C. Este período de tempo (entre cinco e sessenta minutos de reperfusão sanguínea tecidual) caracteriza a fase crítica da lesão por reperfusão neste animal, especificamente. Resultado de menor significância estatística encontra-se na comparação entre os tempos de reperfusão de 60 e 120 minutos, quando ocorreu uma discreta elevação da intensidade da proteína aos 120 minutos de reperfusão, observada pela diferença entre média dos postos com valor negativo entre estes tratamentos. A comparação do tempo de isquemia com o tempo de reperfusão tecidual de 60 minutos apresentou pouca significância estatística ($P < 0,05$), mas suficiente para destacar o agravamento da lesão por reperfusão aos 60 minutos quando comparada á lesão causada pela isquemia.

A variação na resposta individual foi evidente durante a análise dos dados do animal C, que apenas teve a expressão da proteína fortemente demonstrada no segmento controle enquanto todos os demais segmentos tiveram a proteína fracamente expressada, apesar da discreta elevação da expressão da proteína aos 120 minutos de reperfusão, como demonstra a Figura 9.

TABELA 4 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal C (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	14.313	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	24.500	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T4	31.375	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	9.813	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T3	10.188	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	17.063	98,5	* P<0.05
T2 vs. T5	-4.500	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T4	6.875	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	-14.688	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	-21.563	98,5	** P<0.01

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

Beta- catenina

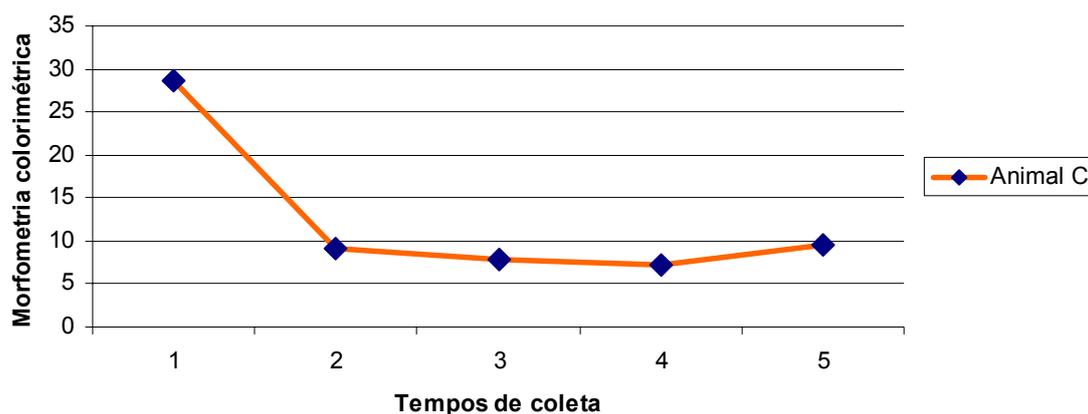


FIGURA 9 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal C nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Para o animal D a significância estatística foi extrema ($P < 0,001$) na comparação de T1 ao T4 e na comparação de T1 ao T5, tempos que caracterizaram maiores lesões teciduais no animal em questão, quando comparados ao segmento controle. Entretanto, quando T2 foi comparado ao T4, neste animal, houve uma menor significância estatística ($P < 0,01$) que indica uma relevante progressão da lesão da reperfusão mesmo após a injúria causada pela isquemia tecidual. Quando T2 foi comparado ao T5 houve nova diminuição da significância estatística ($P < 0,05$) que demonstra o discreto aumento da expressão da proteína em T5, mas os dados de T5 ainda podem ser considerados relevantes para a confirmação do agravamento da lesão por reperfusão aos 120 minutos, neste animal, em comparação às lesões isquêmicas. A lesão pós-reperfusão é evidente no animal D já a partir do tempo três, quando a Tabela 5 mostra significância estatística ($P < 0,05$) entre o segmento controle e os cinco primeiros minutos de reperfusão, ainda que com uma significância menor quando comparada à outros tempos de reperfusão.

O animal D mostrou maior resistência à lesão isquêmica, haja vista que a forte expressão da proteína manteve-se no período de isquemia. No entanto, infere-se que o animal D possa ser mais suscetível à lesão pós-reperfusão, pois apresentou súbita diminuição da expressão da β -catenina a partir de cinco minutos de reperfusão jejunal. Na reperfusão tecidual com 60 e 120 minutos, a expressão desta proteína manteve-se fraca, porém com uma discreta elevação de sua marcação, conforme observa-se na Figura 10.

TABELA 5 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (H)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	16.813	98,5	* P<0.05
T1 vs. T4	29.313	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	25.875	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	8.813	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	21.313	98,5	** P<0.01
T2 vs. T5	17.875	98,5	* P<0.05
T3 vs. T4	12.500	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	9.063	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	-3.438	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

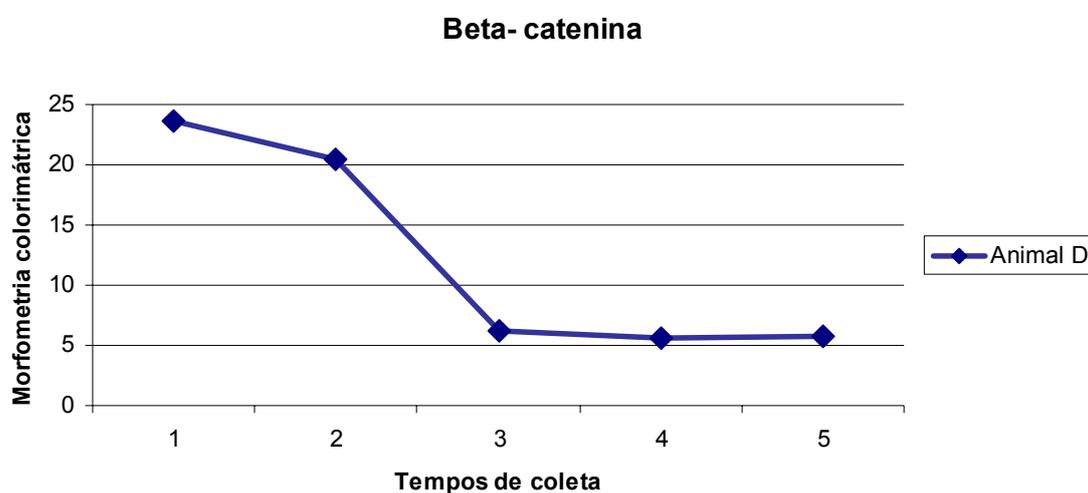


FIGURA 10 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal D nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Resultados com extrema significância estatística ($P < 0,001$) foram encontrados no animal E nas comparações dos tempos T1 ao T4, T1 ao T5 e entre os tempos T2 e T5 conforme observa-se na Tabela 6. Estes resultados demonstram, respectivamente, os tempos que apresentam maiores lesões teciduais quando comparados ao segmento controle e ao segmento isquêmico.

Na Figura 11 observa-se que o animal E apresentou forte expressão da β -catenina apenas no segmento controle. Em todos os demais tempos a marcação foi moderada com progressiva tendência ao agravamento da lesão por isquemia e reperfusão tecidual.

Os resultados estatísticos obtidos para o animal F estão demonstrados na Tabela 7. Pode-se observar que as comparações entre T1 e T4 assim como T1 e T5, neste animal, apresentam extrema significância ($P < 0,001$) estatística, indicando os tratamentos que levaram às maiores injúrias teciduais quando comparados ao segmento controle. A comparação entre T3 e T5 também obteve extrema significância ao teste ($P < 0,001$). Neste caso, o contraste da súbita elevação dos valores dos dados brutos obtidos aos cinco minutos de reperfusão, foi relevante frente à queda dos valores obtidos aos 120 minutos de reperfusão.

A Figura 12 demonstra sob a forma gráfica a reação do animal F frente aos tratamentos. Percebe-se que há uma elevação considerável da expressão da proteína em T3 (classificada como forte) mesmo após uma queda da expressão da mesma em T2 (classificada como moderada). No entanto, com uma hora de reperfusão houve queda da expressão da β -catenina, sugerindo a regressão do quadro de recuperação. Após duas horas da reperfusão tecidual, observou-se diminuição da marcação da proteína, sugerindo que o animal poderia apresentar conseqüências tardias da lesão pós-reperfusão.

TABELA 6 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunohistoquímica da Beta Catenina para o Animal E (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	16.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T4	24.000	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	32.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	8.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	16.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	24.000	98,5	*** P<0.001
T3 vs. T4	8.000	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	16.000	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	8.000	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

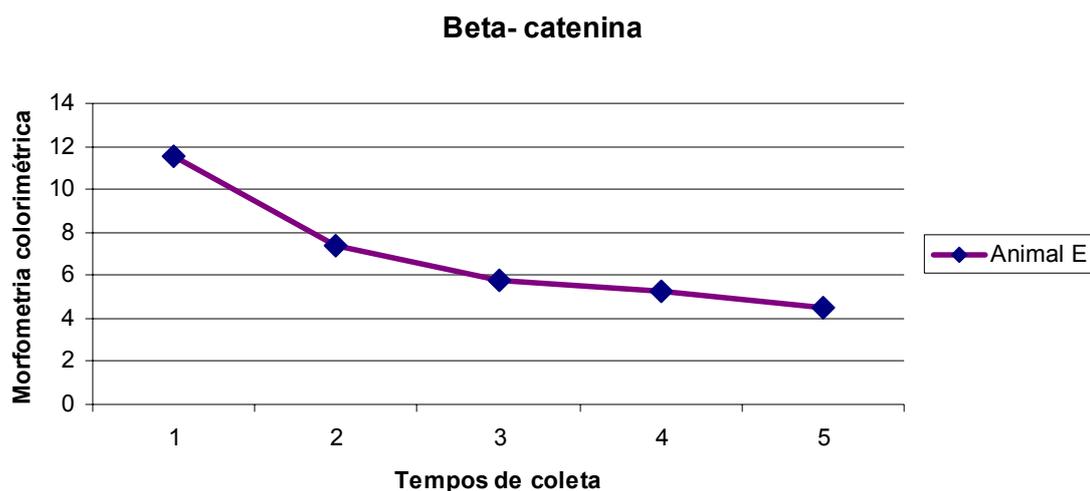


FIGURA 11 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal E nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

TABELA 7 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunistoquímica da Beta Catenina para o Animal F (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (H)	Valor de P
T1 vs. T2	16.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T4	25.000	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	31.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	-8.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	9.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	15.000	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T4	17.000	98,5	* P<0.05
T3 vs. T5	23.000	98,5	*** P<0.001
T4 vs. T5	6.000	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

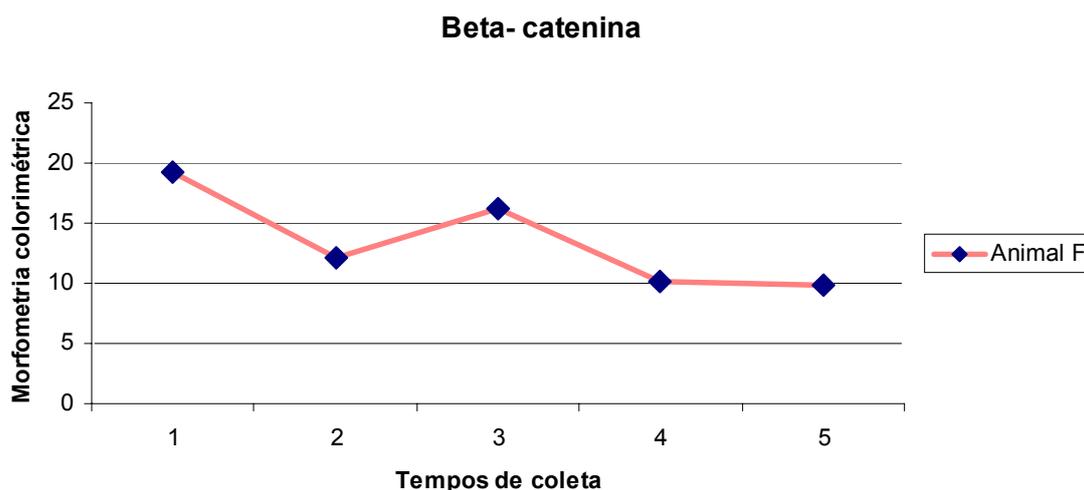


FIGURA 12 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal F nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Resultados com extrema significância estatística ($P < 0,001$) foram encontrados no animal G quando os tratamentos dados nos tempos T1 e T3, T1 e T5, T2 e T5 foram comparados. Todos os resultados para o animal G estão apresentados na Tabela 8. A significância estatística entre T1 e T3 infere a diminuição acentuada dos valores dos dados obtidos aos cinco minutos de reperfusão quando comparados aos valores dos dados do segmento controle, indicando lesão tecidual severa já aos cinco minutos de reperfusão. Da mesma forma $P < 0,001$ na comparação entre os tratamentos aplicados em T1 e T5 também indica relevante lesão aos 120 minutos pós-reperfusão em relação ao segmento controle. O agravamento da lesão por reperfusão tecidual em comparação aos danos causados pela isquemia, neste animal, são identificados pelo valor de $P < 0,001$ na comparação de T2 e T5.

De acordo com Figura 13, o animal G demonstrou forte expressão da proteína no segmento controle. Durante o período de isquemia, a expressão foi moderada e sofreu progressiva queda durante o período inicial de reperfusão de cinco minutos, quando se mostrou fraca. Com uma hora de reperfusão tecidual a expressão da proteína foi moderada, inferindo que o animal reagiu positivamente. Entretanto, fez-se presente a tendência ao agravamento da lesão por reperfusão aos 120 minutos, quando a marcação tornou-se fraca, assim como no início da reperfusão.

TABELA 8 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Beta Catenina para o Animal G (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	24.000	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T4	16.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T5	32.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	16.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	8.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	24.000	98,5	*** P<0.001
T3 vs. T4	-8.000	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	8.000	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	16.000	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

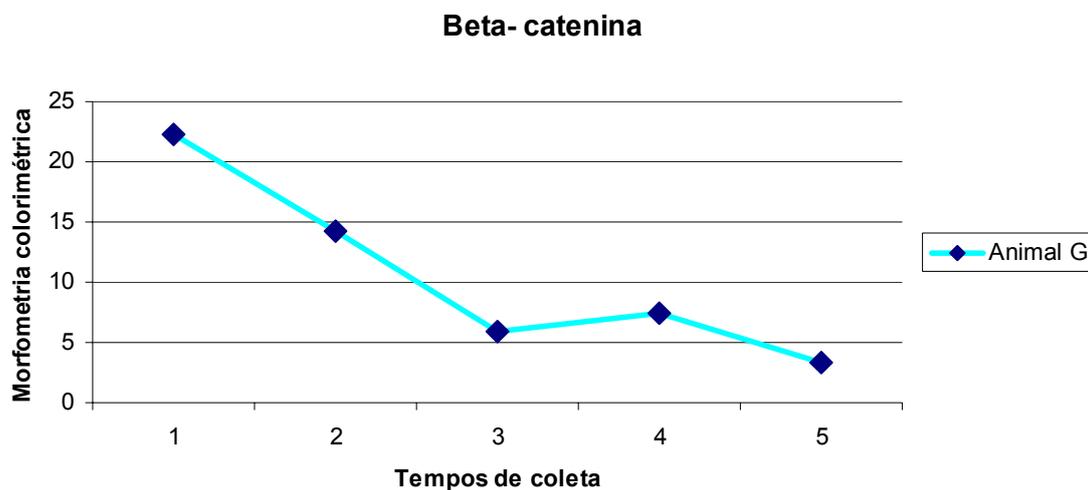


FIGURA 13 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da β -catenina da mucosa jejunal do animal G nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Apesar das diferenças individuais da expressão da β -catenina, a análise estatística demonstrou que os animais submetidos ao mesmo tratamento reagiram de maneira diferente entre os tempos de tratamento, porém mantiveram algumas relações quando comparados entre si, seguindo uma tendência de reação esperada em injúrias por isquemia e reperfusão.

No presente trabalho, os resultados obtidos por meio da imunistoquímica para a β -catenina em jejuno de eqüinos, revelaram a tendência da expressão da mesma reduzir progressivamente durante os tempos de isquemia arteriovenosa completa de uma hora e reperfusão tecidual de cinco, 60 e 120 minutos (Figura 8). Tais achados foram semelhantes ao relatado por LARSSON (2006), em estudo realizado em intestino delgado de ratos, no qual comparou a presença de E-caderina e β -catenina *in vitro*, em processos que gerem necrose e apoptose, por meio de imunofluorescência.

Em estudo realizado em miocárdio de suínos, KHAN et al. (2005) demonstraram que a aprotinina, uma droga que reduz a degradação das proteínas das junções de aderência, entre elas, a β -catenina, reduz também o edema no tecido do miocárdio submetido à isquemia e reperfusão. Os resultados do trabalho acima citado demonstram que a ruptura das junções de aderência está diretamente relacionada com o aparecimento e a intensidade do edema, em um modelo de isquemia e reperfusão. Como os resultados do presente trabalho demonstram exatamente que a queda da expressão da β -catenina, ou seja, a degradação das junções de aderência é proporcional à intensidade do edema, pode-se inferir que o mecanismo de instalação do edema no atual modelo experimental também está relacionado à integridade das junções.

b) Localização e expressão da ocludina

Em todas as amostras estudadas, a ocludina foi encontrada em marcação intracitoplasmática, principalmente, próxima da membrana celular e de distribuição homogênea. Além disso, observou-se marcação de microvilosidades e células caliciformes (Figura 14). A ocludina mostrou-se fortemente marcada em todas as amostras do Tempo 1. .

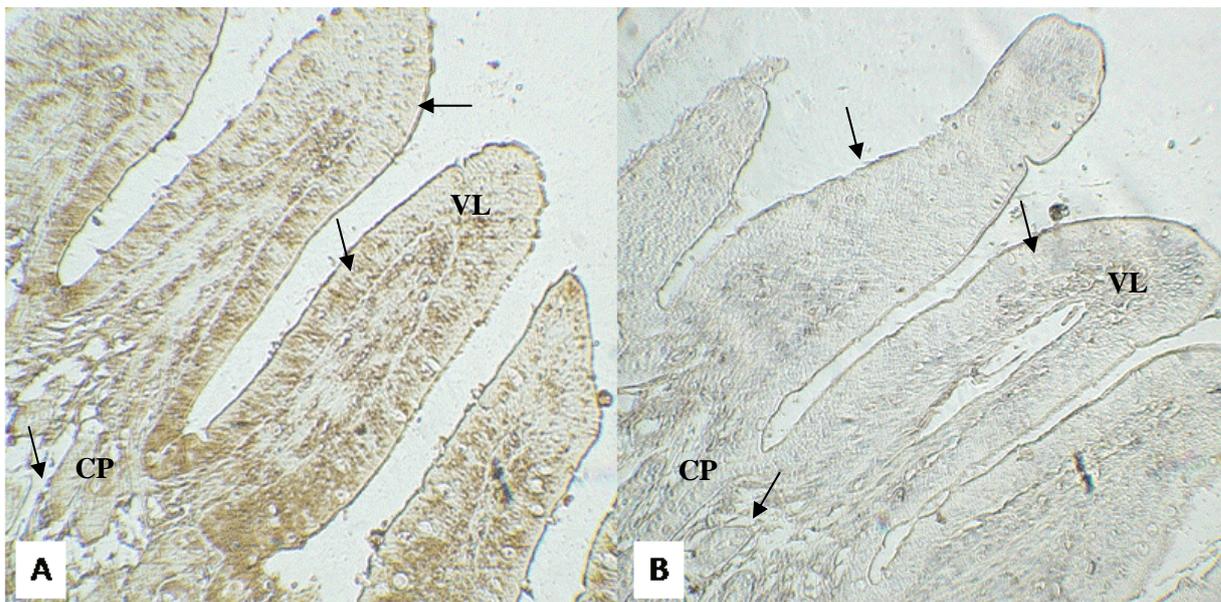


FIGURA 14 - Fotomicrografias representativas da marcação com anticorpo anti- occludina em cortes de intestino delgado de eqüinos submetidos á isquemia e reperfusão. (A) Forte expressão da proteína occludina no epitélio das vilosidades (VL), microvilosidades e criptas jejunais (CP) no Tempo 1. Animal B1 (Aumento de 40 x). (B) Fraca expressão da proteína occludina no epitélio das vilosidades, microvilosidades (VL) e criptas jejunais (CP) no Tempo 5. Animal B5. (Aumento de 40x).

Os resultados estatísticos da morfolometria para occludina para o animal A demonstram extrema significância ($P < 0,001$) entre os tempos T1 e T3 e entre T1 e T5, o que indica a também significante lesão às proteínas pela reperfusão, mesmo aos cinco minutos de sua instalação tecidual pós-isquêmica, quando estas amostras foram comparadas ao segmento controle. Menor significância ($P < 0,01$) foi observada entre os tempos T2 e T5, logo, tem-se que as injúrias às junções de oclusão no momento de reperfusão de 120 minutos foram ainda maiores do que as lesões isquêmicas. A comparação estatística entre os tempos T1 e T4 também foram significantes ($P < 0,05$). Apesar da menor significância, apontaram um início do agravamento da lesão isquêmica já evidente aos 60 minutos de reperfusão. Em conjunto, entende-se que as lesões às proteínas durante a isquemia foram agravadas principalmente aos 120 minutos de reperfusão, neste animal.

O animal A reagiu à injúria de isquemia e reperfusão demonstrando diminuição da expressão da ocludina de maneira gradual. A expressão da ocludina manteve-se forte apenas nos segmentos controles, moderada no tempo de isquemia e, a partir do início da reperfusão, ocorreu acentuada diminuição da expressão desta proteína, que se tornou fracamente expressa (Tabela 9 e Figura 15).

Extrema significância estatística ($P < 0,001$) foi encontrada nas comparações dos tempos T1 e T4 e entre os tempos T1 e T5 no animal B. Há menor significância ($P < 0,01$) entre T1 e T3. Estas significâncias estatísticas observadas nos três tempos do estudo da reperfusão tecidual mostram a intensidade das lesões à ocludina pela reperfusão em comparação ao segmento controle, principalmente aos 60 e 120 minutos. A significância atribuída à comparação dos tempos T2 e T5 ($P < 0,05$), apesar de menor, pode demonstrar o agravamento da lesão da proteína em estudo durante a reperfusão de 120 minutos em comparação aos danos causados nas proteínas ocludina durante a isquemia tecidual, conforme observado na Tabela 11.

No animal B, a expressão da ocludina manteve-se forte no período de isquemia, porém, súbita e fraca expressão da proteína nos Tempos 3,4 e 5 podem ser observadas na Figura 16, sugerindo uma maior sensibilidade individual para a injúria pós-reperfusão.

TABELA 9 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal A (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (H)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	23.750	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T4	19.000	98,5	* P<0.05
T1 vs. T5	29.250	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	15.750	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	11.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	21.250	98,5	** P<0.01
T3 vs. T4	-4.750	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	5.500	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	10.250	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

TABELA 10 – Médias dos valores absolutos (n=8) individuais obtidos da avaliação morfocolorimétrica para determinação da expressão imunoistoquímica da Ocludina para os Animais de A a G nos tempos de 1 a 5.

TEMPO	ANIMAL						
	A	B	C	D	E	F	G
1	14,41	23,07	24,49	17,59	17,38	20,36	18,44
2	8,40	19,37	9,30	11,63	8,58	14,05	17,59
3	3,48	5,33	6,79	10,42	6,11	14,87	9,12
4	3,75	5,14	6,62	7,73	3,63	14,20	15,19
5	3,08	5,00	6,47	9,29	2,45	11,90	3,97

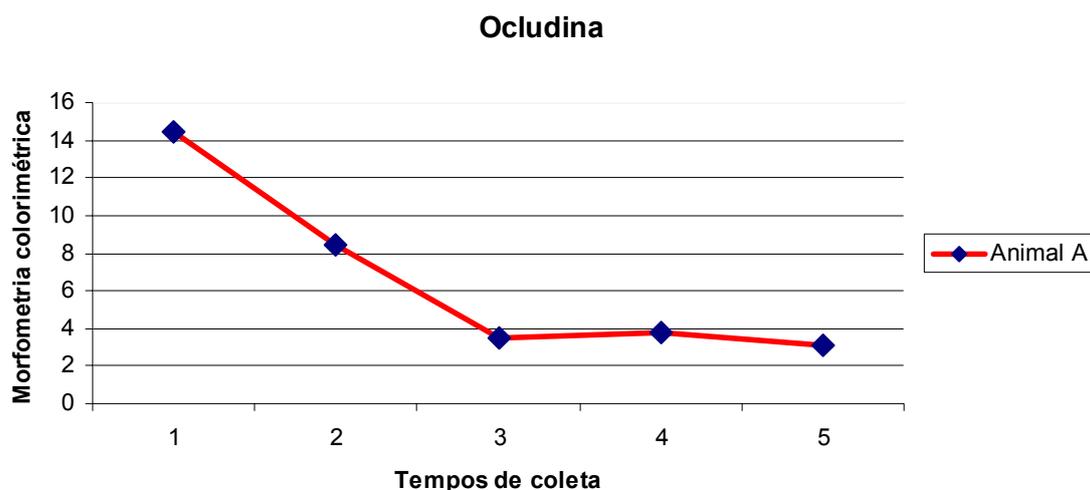


FIGURA 15 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal A nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

TABELA 11 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal B (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	21.625	98,5	** P<0.01
T1 vs. T4	24.375	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	26.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	13.625	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	16.375	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	18.000	98,5	* P<0.05
T3 vs. T4	2.750	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	4.375	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	1.625	98,5	ns P>0.0

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

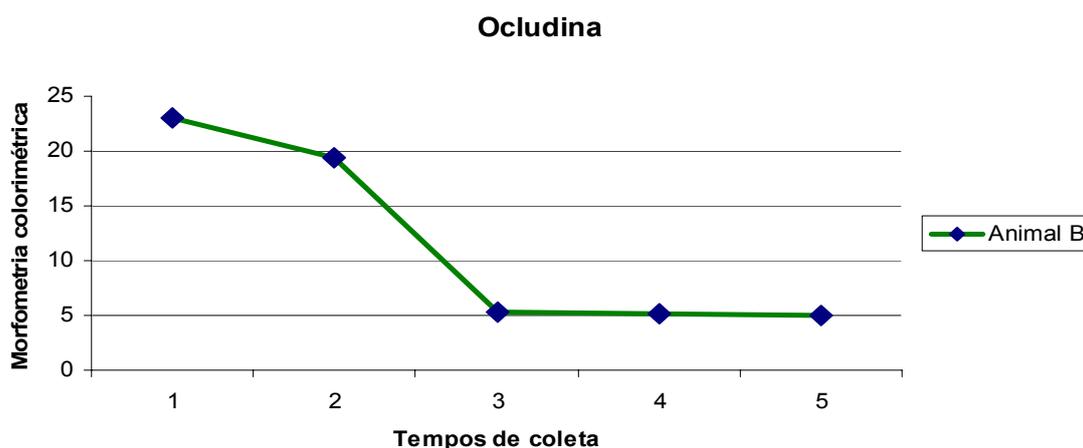


FIGURA 16 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal B nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Semelhantemente ao animal B, no animal C extrema significância estatística ($P < 0,001$) foi encontrada nas comparações dos tempos T1 e T4 e entre os tempos T1 e T5. Há menor significância ($P < 0,01$) entre T1 e T3. Estas significâncias estatísticas observadas nos três tempos do estudo da reperfusão tecidual mostram a intensidade das lesões à ocludina pela reperfusão em comparação ao segmento controle, principalmente aos 60 e 120 minutos. A significância atribuída à comparação dos tempos T2 e T5 ($P < 0,05$), apesar de menor, pode demonstrar o agravamento da lesão à proteína em estudo durante a reperfusão de 120 minutos em comparação aos danos causados às proteínas ocludina durante a isquemia tecidual, conforme observado na Tabela 12.

O animal C reagiu à injúria de isquemia e reperfusão demonstrando diminuição da expressão da ocludina de maneira gradual. A expressão da ocludina manteve-se forte apenas nos segmentos controles, moderada no tempo de isquemia e, a partir do início da reperfusão, ocorreu acentuada diminuição da expressão desta proteína, que se tornou fracamente expressa (Figura 17).

TABELA 12 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal C (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	21.125	98,5	** P<0.01
T1 vs. T4	23.813	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	27.063	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	13.125	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	15.813	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	19.063	98,5	* P<0.05
T3 vs. T4	2.688	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	5.938	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	3.250	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

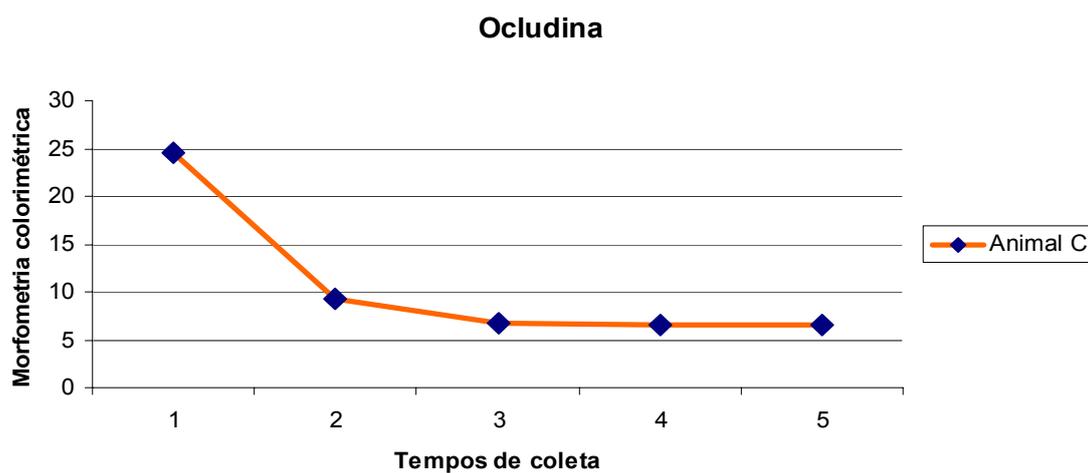


FIGURA 17 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal C nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Os resultados estatísticos obtidos pela avaliação dos dados brutos nos tratamentos aplicados ao animal D apontam alta significância ($P < 0,001$) entre o segmento controle e os tempos de reperfusão de 60 e 120 minutos assim como entre o tempo de isquemia e de reperfusão de 60 minutos, demonstrados na Tabela 13. Estes dados traduzem o agravamento da lesão à proteína pela reperfusão de 60 minutos quando comparada ao dano à ocludina causado apenas quando a isquemia foi aplicada neste animal.

A forte expressão da Ocludina no Tempo 1 do animal D diminui e tornou-se moderada em todos os demais tempos aferidos, conforme observa-se na Figura 18.

TABELA 13 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal D (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	8.125	98,5	ns $P > 0.05$
T1 vs. T3	16.188	98,5	ns $P > 0.05$
T1 vs. T4	32.000	98,5	*** $P < 0.001$
T1 vs. T5	23.688	98,5	*** $P < 0.001$
T2 vs. T3	8.063	98,5	ns $P > 0.05$
T2 vs. T4	23.875	98,5	*** $P < 0.001$
T2 vs. T5	15.563	98,5	ns $P > 0.05$
T3 vs. T4	15.813	98,5	ns $P > 0.05$
T3 vs. T5	7.500	98,5	ns $P > 0.05$
T4 vs. T5	8.313	98,5	ns $P > 0.05$

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa ($P < 0,001$).

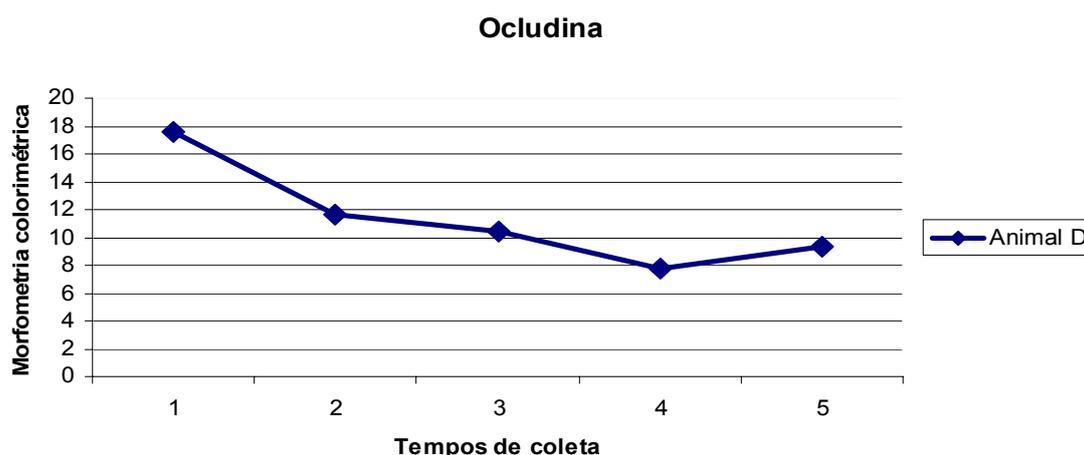


FIGURA 18 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal D nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

No animal E os resultados estatísticos demonstram extrema significância ($P < 0,001$) entre o segmento controle e os tempos de reperfusão de 60 e 120 minutos assim como entre o tempo de isquemia e de reperfusão de 120 minutos, demonstrados na Tabela 14. Estes dados refletem o agravamento da lesão à Ocludina pela reperfusão de 120 minutos quando comparada ao dano à ocludina mensurado durante o tempo de isquemia neste animal.

Neste eqüino, a expressão da Ocludina manteve-se moderada nos Tempos 2 e 3. Entretanto, nos Tempos 4 e 5 observou-se fraca expressão, inferindo vulnerabilidade deste animal ao aumento da permeabilidade paracelular e suas conseqüências principalmente aos 120 minutos de reperfusão tecidual, conforme pode-se visualizar na Figura 19.

TABELA 14 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal E (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	8.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	16.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T4	24.000	98,5	*** P<0.001
T1 vs. T5	32.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	8.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	16.000	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	24.000	98,5	*** P<0.001
T3 vs. T4	8.000	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	16.000	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	8.000	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significante (P<0,001).

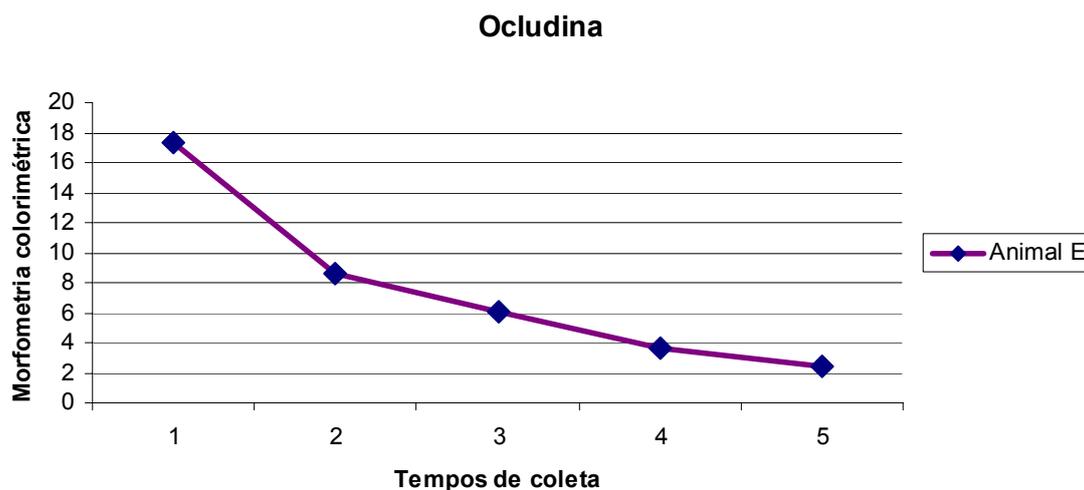


FIGURA 19 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal E nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

Para o Animal F, resultados estatisticamente significantes podem ser observados na Tabela 15. A maior significância ($P < 0,001$) na comparação entre tratamentos neste animal está apresentada entre os tempos T1 e T5, o que demonstra uma severa diminuição na intensidade da expressão entre o segmento controle e os 120 minutos de reperfusão. A tabela também mostra significância menor ($P < 0,01$) entre os Tempos T3 e T5, indicando o agravamento às lesões à Ocludina no período de reperfusão entre cinco e 120 minutos. Observa-se, adicionalmente, pouca significância entre os Tempos T1 e T2 ($P < 0,05$) e entre T1 e T4 ($P < 0,05$), o que mostra a reação protéica (com tendência para perda da expressão da Ocludina) nos tempos referidos.

Quanto a determinação da intensidade da expressão da proteína no animal F tem-se que, a Ocludina demonstrou forte expressão tecidual tanto no Tempo 1 quanto nos Tempos 2, 3 e 4, o que infere maior resistência deste equino à injúria à proteína na lesão por isquemia e reperfusão. Apenas no Tempo cinco, a expressão da ocludina foi moderada, o que sugere, apesar disso, que as lesões à proteína foram agravadas em consequência à reperfusão, especialmente aos 120 minutos do estabelecimento da mesma, conforme se observa na Figura 20.

Na Tabela 16 estão apresentados os resultados estatísticos que comprovam extrema significância ($P < 0,001$) na comparação entre T1 e T5 assim como entre T2 e T5. Estes resultados demonstram a variação da diminuição da expressão protéica entre os tempos citados, sugerindo, desta forma, um severo agravamento da lesão à Ocludina desde sua mensuração no tratamento da isquemia até os 120 minutos de reperfusão. Entre os Tempos T1 e T3 pode ser observada menor significância estatística ($P < 0,01$), desta vez, a significância está associada ao aumento da marcação da proteína no tecido quando a injúria de reperfusão de apenas cinco minutos foi comparada ao segmento controle. Este comportamento da proteína, observada no Tempo 3, também pode ser observada na comparação entre T2 e T3 ($P < 0,05$), indicando, da mesma forma, uma maior marcação imunoistoquímica da proteína depois do início da reperfusão tecidual, mensurada aos cinco minutos.

Inicialmente, o animal G teve marcação moderada para Ocludina no Tempo 2. No Tempo 3 este animal apresentou súbito aumento da marcação da proteína que voltou a corar-se intensamente. Porém, no Tempo 5 houve drástica

queda da expressão da proteína, a qual se marcou fracamente. Isto sugere um agravamento à lesão protéica após reperfusão tardia (mensurada aos 120 minutos).

TABELA 15 - Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal F (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (H)	Valor de P
T1 vs. T2	19.188	98,5	* P<0.05
T1 vs. T3	11.000	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T4	17.813	98,5	* P<0.05
T1 vs. T5	32.000	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	-8.188	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T4	-1.375	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	12.813	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T4	6.813	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	21.000	98,5	** P<0.01
T4 vs. T5	14.188	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

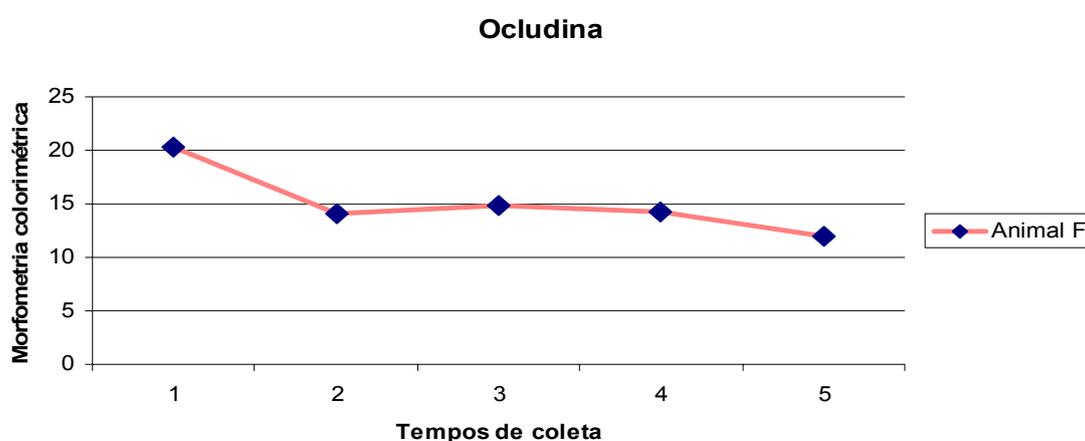


FIGURA 20 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal F nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

TABELA 16 – Comparações dos valores absolutos obtidos da avaliação morfocolorimétrica para expressão imunoistoquímica da Ocludina para o Animal G (n=08) nos tempos de 1 a 5.

Comparações	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
T1 vs. T2	4.625	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T3	22.313	98,5	** P<0.01
T1 vs. T4	14.313	98,5	ns P>0.05
T1 vs. T5	30.313	98,5	*** P<0.001
T2 vs. T3	17.688	98,5	* P<0.05
T2 vs. T4	9.688	98,5	ns P>0.05
T2 vs. T5	25.688	98,5	*** P<0.001
T3 vs. T4	-8.000	98,5	ns P>0.05
T3 vs. T5	8.000	98,5	ns P>0.05
T4 vs. T5	16.000	98,5	ns P>0.05

Teste de Kruskal-Wallis (Teste de Dunn).

*** Estatisticamente significativa (P<0,001).

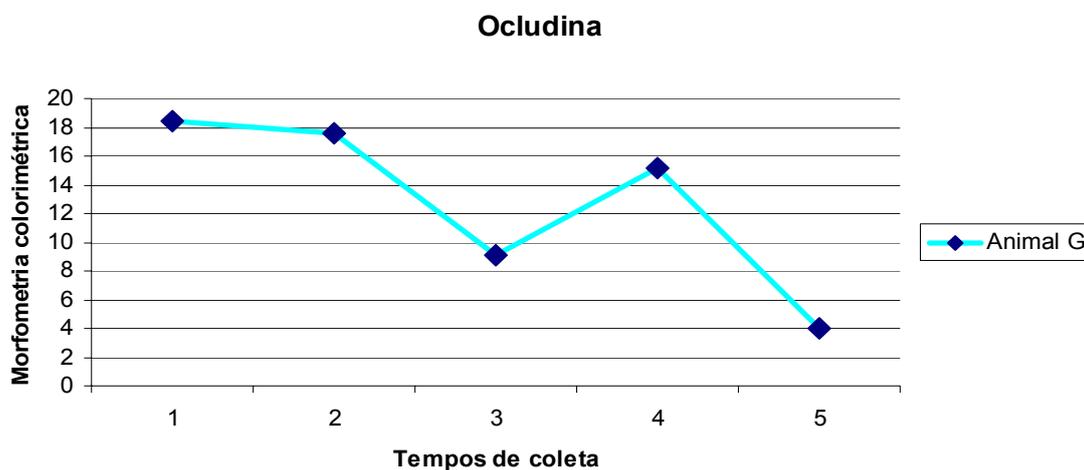


FIGURA 21 – Médias da morfometria colorimétrica obtidas na Imunoistoquímica para a expressão da Ocludina da mucosa jejunal do animal G nos tempos de coleta de amostras de biópsias (1 a 5).

5.3 Relevância clínica

A fosforilação dos componentes das junções de oclusão é uma etapa importante na regulação das funções das junções de oclusão. As proteínas regulatórias das JO (ZO-1, ZO-2, ZO-3 e Ocludina) são fosfoproteínas. A fosforilação da ocludina correlaciona-se com sua localização e funções nas JO. Além disso, a fosforilação da ocludina pode estar envolvida na formação das JO. Ruptura da integridade das JO por depleção de ATP induz a uma diminuição da fosforilação de todas as proteínas regulatórias, seguida de um aumento da fosforilação durante repleção de ATP. Diferentes estágios de fosforilação das proteínas das JO podem explicar as diferenças na permeabilidade entre ensaios *in vitro* (FURUSE et al., 1994; WARD et al., 2000).

Em células endoteliais em cultura, demonstrou-se que a reoxigenação por H₂O₂ determinava redistribuição da ocludina, o que estava diretamente relacionado ao aumento da permeabilidade paracelular (edema) e era dependente da ativação da via de transdução de sinal das quinases ativadas por mitógeno (MAP quinases) p44 e p42 (FISCHER et al., 2005). Foi demonstrado nos mesmos tecidos utilizados no presente experimento que as MAP quinases p44 e p42 eram ativadas na mucosa tanto na fase de isquemia quanto de reperfusão, com expressão nuclear de intensidade 2,3 vezes maior no Tempo 5 que no Tempo 1 (BRANDSTETTER, 2006). Assim, pode-se observar que nos animais estudados há uma estreita relação entre a ativação da via de transdução da MAP quinase e da queda na expressão da ocludina, o que pode estar diretamente relacionado com o aparecimento do edema.

O mesmo padrão (via) de sinalização que induz a fosforilação das proteínas da JO pode também modular o citoesqueleto de actina. O citoesqueleto de actina associa-se á membrana plasmática, especificamente através uma rede de filamentos abaixo das JO e através de um anel de filamentos de actina ao nível das junções de aderência. Em íleo de porquinhos da índia, a ruptura do citoesqueleto de actina por drogas tais como citocalasina D aumentou o fluxo de sódio e manitol, sugerindo a importância da integridade do citoesqueleto para a função dos complexos juncionais (WARD et al., 2000). Na presente investigação, foi demonstrada a queda da expressão da β -catenina, o que sugere que também que neste modelo há comprometimento simultâneo das junções de aderência e das JO.

Em um estudo que visou o exame dos efeitos e mecanismos de ação de espécies de oxigênio reativo na função intestinal de barreira e de portão entre células, concluiu-se que oxidantes não apenas rompem a actina perijuncional, mas também causam redistribuição das proteínas da JO resultando no comprometimento da barreira epitelial intestinal e nas suas funções de portão e cerca. Estes efeitos contribuem para o desenvolvimento de má absorção e disfunções associadas à inflamação da mucosa do trato digestório. Este trabalho demonstrou que um evento precoce de injúria oxidante é a redistribuição compartimental de proteínas chaves associadas às JO seguidas por diminuições específicas do total de suas expressões para ZO-1 e ocludina, mas não para claudinas, o que afeta o transporte epitelial e outras funções contribuindo para o observado desenvolvimento de má absorção e diarreia (MUSCH et al., 2005). Apesar de não ter sido realizado acompanhamento clínico posterior ao término da reperfusão nos eqüinos neste experimento, pode-se supor que a queda na expressão da ocludina poderia estar relacionada com sinais clínicos comuns no pós-operatório de casos de torção intestinal com isquemia e reperfusão, como a diarreia.

Entretanto, trabalhos realizados em modelos de isquemia e reperfusão intestinal em eqüinos são limitados, por esse motivo ainda não foi determinada a relevância clínica deste fenômeno. As evidências contraditórias a respeito do desenvolvimento da injúria de reperfusão em intestinos delgado e grosso de cavalos e pôneis é provavelmente um reflexo dessa limitação, incluindo o tipo de isquemia realizado e a duração dos períodos de isquemia e reperfusão estudados. Em adição, o conjunto de diferentes variáveis existentes nestes estudos interfere nos resultados. A argumentação destes trabalhos é embasada em resultados obtidos de modelos experimentais de isquemia e reperfusão em situações controladas (MOORE et al., 1997).

Apesar da relevância clínica da injúria por isquemia e reperfusão intestinal permanecer desconhecida, evidências experimentais demonstram que o período de reperfusão exacerba a lesão isquêmica em intestinos delgado e grosso. Os mecanismos patofisiológicos da lesão por isquemia e reperfusão no intestino delgado de eqüinos são aparentemente semelhantes à cascata clássica da injúria por reperfusão (MOORE, 1997).

Deste modo, futuras elucidações dos mecanismos patofisiológicos desta condição e a identificação de efetivas estratégias de tratamento desta injúria poderiam ser elucidadas.

6 CONCLUSÃO

Nas condições de realização do presente experimento, foi possível concluir que:

- 1) As proteínas β -catenina e ocludina presentes no epitélio jejunal dos eqüinos expressaram tendência de diminuição na marcação imunistoquímica durante o desenvolvimento de isquemia arteriovenosa completa e reperfusão tecidual o que demonstra a degradação das JA diretamente relacionada á progressão do edema e agravamento da lesão por isquemia durante o episódio de reperfusão, e aumento da permeabilidade via paracelular e suas conseqüências relacionados á degradação da ocludina.
- 2) A avaliação histopatológica demonstrou lesões degenerativas leves á moderadas da mucosa jejunal no período de isquemia e o agravamento progressivo das lesões observado nos tempos de reperfusão indicando tendência no agravamento da injúria da mucosa intestinal que acomete inicialmente o topo das vilosidades e segue em direção às criptas e camadas mais profundas, pela perda progressiva da adesividade intercelular, semelhantemente ao que foi observado na imunistoquímica.

REFERENCIAS

1. ABREU, G. M. J.; ALVES, S. E. G.; VASCONCELOS C. A.; RIBEIRO FILHO, D. J.; FALEIROS, R. R. Efeitos da isquemia e da reperfusão na ocorrência de apoptose no jejuno em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.1, p.35-40, 2007.
2. ALLEN, D. TYLER, D. E. Pathophysiology of acute abdominal disease. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. c.3, p.65-87.
3. ANDERSON, M. J. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. **Physiology Science News**, v. 16, 2001.
4. ARAÚJO, G. A. **Biochemical and structural evidences for pig miocardium adherens junctions disruption by cardiopulmonary bypass**. 2001. 116 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal.
5. ARGENZIO, A. R. Funções gerais do trato gastrointestinal e seu controle e integração. In: SWENSON J. M.; REECE O. W. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. c.16, p.297-306.
6. BABB, S. G.; KOTRADI, S. M.; SHAH, B.; WILLIAMSON, C. C.; BELL, L. N.; SCHMEISER, G.; CHEN, E.; LIU, Q.; MARRS, J. A. Zebrafish R-cadherin (Cdh4) controls visual system development and differentiation. [Developmental Dynamics](#), New York, v.233, n.3, p.930-945, 2005.
7. BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 8.ed. São Paulo: Manole, 1991. 629p.
8. BEHMER, A. O., TOLOSA, C. M. E.; NETO, F. G. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora da universidade de São Paulo, 1975. 241p.
9. BLASCHUK, O. W., SULLIVAN, R., DAVID, S. AND POULIOT, Y. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. **Developmental Biology**, San Diego, v.130, p.227-229, 1990.
10. BOWLEY, E.; GORMAN, B. D. Beta-catenin signaling in fibroproliferative disease. **Journal of Surgical Research**, New York, v.138, p.141–150, 2007.
11. BRANDSTETTER, L. R. G. **Perfil de ativação das MAPquinases ERK 1/2 no intestino delgado de eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão**. 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
12. BRODY, T. B. Proteínas que compõem o domínio intracitoplasmático das caderinas. **The Interactive Fly** [on line]. 1996. Disponível em:

<http://www.sdbonline.org/fly/segment/armadlo2.htm#EvHoms>. Acesso em: 15 jul 2005.

13. CONACCI-SORRELL, M.; ZHURINSKY, J.; BEN-ZE'EV, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.109, n.8, p.987-991, 2002.
14. COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. U.S.A.: ASM press, 1997. 673p.
15. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robins: Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara, 6ed., 2000, 1251p.
16. DABAREINER, M. R.; SNYDER, R. J.; WHITE, A. N.; PASCOE, R. J.; HARMON, A. F.; WOLINER, J. M.; PINNEY, D.; SULLINS E. K. Microvascular permeability and endothelial cell morphology associated with low-flow ischemia/reperfusion injury in the equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.56, n.5, p. 639-648, 1995.
17. DROY-LEFAIX.; DROUET, Y.; GERALD, G.; HOSFORD, D.; BRAQUET, P. Superoxide dismutase (SOD) and the PAF-antagonist (BN 52021) reduce small intestinal damage induced by ischemia-reperfusion. **Free Radicals Research Community**, v. 12. n. 2, 1991.
18. EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SCHAFF, H. V. Impaired endothelium – dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. **The Annals Thoracic Surgery**, Boston, n.57, p.1550-6, 1994.
19. FALEIROS, R. R. **Ocorrência e tratamento da injúria de reperfusão no atendimento clínico e cirúrgico da síndrome cólica**. IV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesia Veterinária, Goiânia, 2000.
20. FISCHER, S.; WIESNET, M.; RENZ, D.; SCHAPER, W. H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. **European Journal of Cell Biology**. Stuttgart, v.84, n.7, p.687-697, 2005.
21. FURUSE, M.; ITOH, M.; HIRASE, T.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA SH. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. **The Journal of Cell Biology**. Stuttgart, v.127, n.6, p.1617-1626, 1994.
22. GOLOUBEFF, B. **Abdome agudo eqüino**. São Paulo: Loyola, 1993. 174 p.
23. GRIMSON, M. J.; COATES, J. C.; REYNOLDS, J. P.; MARK, S.; BLANTON, R. L.; HARWOOD, A. J. Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. **Journal of Nature**. v. 408 n. 6813, pg 727-731, 2000.

24. HENNINGER, D. W.; SNYDER, J. R.; PASCOE, J.R. Microvascular permeability changes in ischemia-reperfusion injury in the ascending colon of horses. **Journal of American Medical Association**, v.201, p. 1191-1196, 1992.
25. KUEBLER, F. J.; TTH, B.; RUE, W. L.; BLAND, I. K.; CHAUDRY, H. I. Differential alterations in intestinal permeability after trauma-hemorrhage. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 112, p.198-204, 2003.
26. JONES, L. S.; SNYDER, R. J.; SPIER, J. S. Fisiopatologia da lesão intestinal. In: REED, M. S.; BAYLY, M. W. **Medicina interna eqüina**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. c.12.6, p. 547-549.
27. JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.
28. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1995. 433 p.
29. KHAN, T. A.; BIANCHI, C.; ARAUJO, E; VOISINE, P.; XU, S.; FENG, J.; LI, J.; SELLKE, F. Aprotinin preserves cellular junctions and reduces myocardial edema after regional ischemia and cardioplegic arrest. **Circulation**, Dallas, v.112, p.1196-1201, 2005
30. LARSSON, L. I. Distribution of E-cadherin and Beta-catenin in relation to cell maturation and cell extrusion in rat and mouse small intestine. **Histochemistry Cell Biology**, v.126, p. 575-582, 2006
31. LUNDIN, C.; SULLINS, E. K.; WHITE, A. N.; CLEM, F. M.; DEBOWES, M. R.; PFEIFFER, A. C. Induction of peritoneal adhesions with small intestinal ischaemia and distention in the foal. **Equine Veterinary Journal**, London, v.21, n.6, p.451-458, 1989.
32. MADRUGA, R. C.; ARAÚJO, R. F.; SOARES, O. C. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
33. MOORE, M. R. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.211, n.11, p.1362-1366, 1997.
34. MOORE, M. R. Principles of intestinal injury and determining intestinal viability. In: AUER, A. J.; STICK, A. J. **Equine surgery**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. c.253, p.216-223.
35. MOORE, M. R., HARDY, J.; MUIR, W. W. Mural blood flow distribution in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.56, n.6, p.812-818, 1995.
36. MOORE, M. R.; BERTONE, L. A.; MUIR, W. W.; STROMBERG, C. P.; BEARD, L. W. Histopathologic evidence of reperfusion injury in the large colon of horses after

- low-flow ischemia. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.55, n.10, p.1434-1443, 1994.
37. MOORE, M. R.; MUIR, W. W.; GRANGER, N. D. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v.9, n.3, p.115-129, 1995.
38. MUIR, W. W.; HUBBELL, E. A. J.; SKARDA, T. R.; BEDNARSKI, M. R. **Manual de anestesia veterinária**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2001. 432 pg.
39. MUSCH, W. M.; WALSH-REITZ, M. M.; CHANG, B. E. Roles of ZO-1, occluding, and actin in oxidant-induced barrier disruption. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, 2005.
40. NUNES, A. V.; GUEDES, C. M. R. Patologias do sistema digestivo. In: SERAKIDES, R.; SANTOS, L. R.; GUEDES, C. M. R.; OCARINO, M. N.; NUNES, A. V.; NOGUEIRA, G. H. R. **Patologia veterinária – cadernos didáticos**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004. c.4, p 103-152.
41. PEREIRA, L. E. F. Etiopatogênese geral das doenças. In: FILHO, B. G.; PEREIRA, L. E. F.; PITTELLA, H. E. J., BABBIRRA, A. E., BARBOSA, A. J. A. **Bogliolo Patologia Geral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989.
42. RAGLE, A.C. The acute abdomen: diagnosis, preoperative management, and surgical approaches. In: AUER, A. J.; STICK, A. J. **Equine surgery**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. c. 26, p.224-231.
43. RIO TINTO, M. J. J.; ALVES, S. E. G.; FALEIROS R. R.; SANTOS, L. R.; MARQUES JUNIOR, P. A.; MELO, G. E. **Utilização de hidrocortizona em eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão no jejuno e suas conseqüências sobre o cório laminar**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.56, n.3, 2004.
44. ROWE, L. M.; WHITE, A. N. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clinical techniques in equine practice**. v.1, n.3, p.148-162.
45. SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, supl.3, 2002.
46. SISSON, S. Sistema digestivo do eqüino. In: GROSSMAN, D. J.; SISSON, S. **Anatomia dos animais domésticos Getty**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. c. 18, p.424-465.
47. ŠLAUS, N. P. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell International**, v.3, n. 3, 2003.

48. ISUN, Z.; WANG, X.; DENG, X.; BORJESSON, A.; WALLEN R.; HALLBERG E.; ANDERSSON, R. Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury. **Shock**, Philadelphia, v.13, n.3, p.209-16.
49. SUZUKI, S.; SANO, T. K.; TANIHARAT, H.; Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. **Cell Regulation**, v.2, p.261-270, 1991.
50. TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **Jornal Vascular Brasileiro**, Rio de Janeiro, v.2, n.2, p.119-28, 2003.
51. WARD, D. P.; TIPPIN, K. T.; THAKKER, R. D. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. **Pharmaceutical science and technology today**. v.3, n.10, p. 346-358, 2000.
52. WARY, K. W. Recognizing scientific excellence in the biology of cell adhesion. **Cell Commun Signal**, v.3, n.7, 2005.
53. WHITE, N. A. Examination and diagnosis of the acute abdomen. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. cap.9, p.310-335.
54. XIN GUO, X.; RAO, N. J.; ZOU, T-T.; TURNER, J. D.; BASS, L. B.; WANG, Y-J. Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines. **American Journal of Physiology Cell**. v. 285, 2003.