

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

**EFEITO DA SOLUÇÃO DE CAROLINA RINSE NA INJÚRIA DE
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EXPERIMENTAL NO INTESTINO
DELGADO DE COELHOS**

Luciana Ramos Gaston Brandstetter
Orientador: Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2011

LUCIANA RAMOS GASTON BRANDSTETTER

**EFEITO DA SOLUÇÃO DE CAROLINA RINSE NA INJÚRIA DE
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EXPERIMENTAL NO INTESTINO
DELGADO DE COELHOS**

Tese apresentada para
obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal junto à Escola
de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Patologia, clínica e cirurgia animal.

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo- EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof.^a Dr.^a Maria Clorinda Soares Fioravanti- EVZ/UFG

Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura- EVZ/UFG

GOIÂNIA
2011

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

Brandstetter, Luciana Ramos Gaston.
B819e Efeito da solução de Carolina Rinse na injúria de isquemia e
reperfusão experimental no intestino delgado de coelhos
[manuscrito] / Luciana Ramos Gaston Brandstetter. - 2011.
127 f. : il.

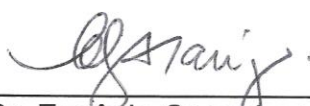
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia, 2011.
Bibliografia.

1. Coelhos – Experimentos. 2. Intestino delgado – Coelhos –
Estudos. I. Título.

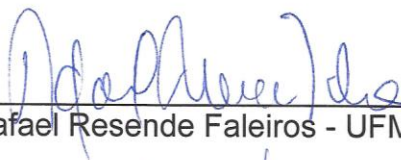
CDU: 619:616.3:636.92

LUCIANA RAMOS GASTON BRANDSTETTER

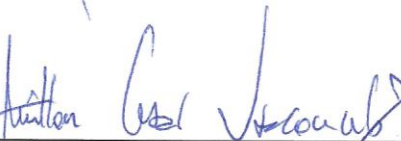
Tese defendida e aprovada em **18/11/2011** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo
(ORIENTADOR (A))



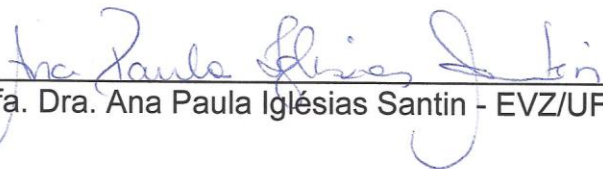
Prof. Dr. Rafael Resende Faleiros - UFMG/MG



Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos - UFMG/G



Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito (memoria)



Profa. Dra. Ana Paula Iglésias Santin - EVZ/UFG

Dedico este trabalho aos meus pais
Walter e Célia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelos caminhos que levam ao conhecimento.

Aos meus pais e irmãos, pela confiança, generosidade e amor infinitos.

À Escola de Veterinária e Zootecnia e ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás, por viabilizar a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Eugênio Gonçalves de Araújo, por ter acreditado em minha capacidade desde o início da graduação e aos meus co-orientadores Maria Clorinda Soares Fioravanti e Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura pela amizade e disposição para esclarecer dúvidas e ajudar sempre que necessário.

Aos amigos, alunos e colegas Adriana Furtado, Antônio Souza, Danilo Rezende e Silva, Gustavo Henrique Coutinho, Helton Freires Oliveira, Jéssica Alves da Silva, Juliana Job Serodio, Tábata Laíza Moraes, Patrícia de Almeida Machado, Maria do Carmo Marques, Natalia Perillo Navarrete Lavers, Priscila Vaz, Sheila de Almeida de Sousa, Vanessa Sousa Cruz Pimenta, Vilda Maria dos Reis, Yandra Cassia Lobato do Prado pela grande ajuda e disponibilidade.

À minha amiga Maria Ivete de Moura, pela amizade e disponibilidade para ajudar.

Aos colegas Juan Carlos Duque Moreno e Leandro Guimarães Franco, por contribuírem substancialmente na realização dos protocolos anestésicos.

Aos professores da Escola de Veterinária e Zootecnia, pela força, colaboração e paciência, em especial os professores Adilson Donizeti Damasceno, Ary da Silva Rodrigues, Dirson Vieira, Luiz Antônio Franco da Silva, Luiz Augusto Batista Brito, Marcos Barcellos Café, Naida Cristina Borges, Olízio Claudino da Silva, Paulo Henrique Jorge da Cunha, Percílio Brasil dos Passos e Rosângela de Oliveira Alves Carvalho.

Ao professor Emmanuel Arnhold, pelas orientações sobre a análise estatística.

Ao Dr. Nathaniel A. White II, pelo envio de material bibliográfico, orientações e disponibilidade.

À empresa HalexIstar Indústria Farmacêutica Ltda, pela doação dos animais.

Aos animais, que perderam a vida para a realização deste experimento.

“A sabedoria própria dos sábios
consiste em uma extraordinária
dose de bom senso”

Reitor W.R. Inge

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1 Introdução.....	1
2 Caracterização do problema.....	2
2.1 Morfologia e função do intestino delgado.....	2
2.2 Isquemia intestinal.....	4
2.3 Reperusão intestinal.....	7
2.4 Alterações morfológicas decorrentes da injúria de reperusão no intestino delgado.....	15
2.5 Apoptose na isquemia e reperusão intestinal.....	17
2.6 O estresse cirúrgico e o intestino.....	19
2.7 MAP Quinases: Proteínas quinases ativadas por mitógeno.....	20
2.7.1 p38 na isquemia e reperusão.....	25
2.7.2 ERK na isquemia e reperusão.....	26
2.8 Importância da isquemia e reperusão intestinal na espécie equina.....	27
2.9 Solução de Carolina Rinse e a injúria de reperusão.....	27
3 Referências.....	32
CAPÍTULO 2- Carolina Rinse Solution does not attenuate ischemia and reperfusion injury in jejunum of rabbits.....	54
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	54
INTRODUCTION.....	55
MATERIAL AND METHODS.....	56
Animals.....	56
Surgical procedure.....	57
Samples harvesting and processing.....	58
Histology.....	59
Data acquisition and statistical analysis.....	60
RESULTS.....	60
Gross changes.....	60
Microscopic study.....	60
DISCUSSION.....	64

CONCLUSION.....	68
ACKNOWLEDGMENTS.....	68
REFERENCES.....	69
CAPÍTULO 3- - Effects of topical and intraluminal Carolina Rinse Solution in p44/42 and p38 MAPK activation profile in rabbit jejunum after ischemia and reperfusion	76
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	76
INTRODUCTION.....	77
MATERIAL AND METHODS.....	78
Animals.....	78
Surgical procedure.....	79
Samples harvesting and processing.....	80
Immunohistochemistry.....	81
Data acquisition and statistical analysis.....	81
RESULTS.....	82
DISCUSSION.....	84
CONCLUSION.....	89
ACKNOWLEDGMENTS.....	89
REFERENCES.....	90
CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
ANEXOS.....	100

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Fotomicrografia de um segmento isolado de jejuno de coelho mostrando a divisão histológica em camadas. H&E, 100X..... 3
- Figura 2 Representação esquemática da conversão da hipoxantina em xantina e ácido úrico. (A) Conversão realizada pela enzima xantina desidrogenase em condições fisiológicas. (B) Quando há reperfusão ocorre conversão realizada pela enzima xantina oxidase com formação de um radical superóxido; reação catalisada pelo oxigênio..... 10
- Figura 3 Cascata de ativação levando à ativação das MKs. Mitógenos e estresse celular promovem ativação das cascatas de ERK 1/2 e p38, que por sua vez, fosforilam e ativam subgrupos de MK..... 25

CAPÍTULO 2

- Figure 1 Schematic representation of mesenteric vessels isolated with nylon monofilament into a small section of polyvinyl urethral tube. Extramural circulation blocked with #2 chromic catgut sutures around the small bowel circumference (black arrows)..... 59
- Figure 2 Photomicrographs of isolated rabbit jejunum. (A) T120r sample from group A. Villi integrity preserved. (B) Changes in the mucosa at T60r sample in group B. Note detachment of enterocytes and lamina propria disintegration (arrows). H&E, 200X..... 61
- Figure 3 Photomicrographs of isolated rabbit jejunum showing T120r sample from group C. (A) Intense hemorrhage in the base of mucosa (stars). (B) Hemorrhage in muscle layers (arrows). H&E, 200X..... 62
- Figure 4 Photomicrographs of isolated rabbit jejunum showing circular (stars) and longitudinal muscle layers (arrows). (A) T5r sample from group A (sham operated); normal aspect. (B) T5r sample from group B; multifocal areas of necrosis. (C) T120r sample from group B; diffused necrosis. (D) T120r sample from group C; diffused necrosis. H&E, 200X..... 63

CAPÍTULO 3

- Figure 1 Mean optical density of phospho-p38 indicating central tendency in different layers of rabbit jejunum, in different groups. (A) Lamina propria; (B) Crypts of Lieberkühn; (C) Circular muscle; (D) Longitudinal muscle; (E) Myenteric plexus; (F) All layers from group A (sham operated)..... 83
- Figure 2 Mean optical density of phospho-p44/42 indicating central tendency in different layers of rabbit jejunum, in different groups. (A) Lamina propria;. (B) Crypts of Lieberkühn; (C) Circular muscle; (D) Longitudinal muscle; (E) Myenteric plexus; (F) All layers from group A (sham operated)..... 84
- Figure 3 (A) Immunostaining for phospho-P44/42 in circular (star) and longitudinal (arrow) muscle layers of rabbit jejunum and (B) corresponding black and white image converted by Image J software for measurement of percentage fraction area (particle analysis). T60r sample from group A. 200X..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF1	fator 1 de transcrição
ATF2	fator 2 de transcrição
ATP	adenosina tri-fosfato
Bcl-2	enzima anti-apoptótica
Bcl-X _L	enzima anti-apoptótica
BMK1	MAP quinase 1 ERK/big
CRS	solução de Carolina Rinse
Cu ⁺	íon cobre
DNA	ácido desoxirribonucleico
eNOS	isoforma constitutiva da óxido nítrico sintetase
Elk-1	fator de transcrição da família ETS
ERK	quinase regulada pela sinalização extracelular
Ets-1	fator de transcrição Ets-1
Fe ⁺⁺	íon ferro
GDP	guanosina difosfato
Glu	glutamina
Gly	glicina
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HSP27	proteína de choque térmico (ativada a jusante de p38)
IL-6	interleucina 6
iNOS	isoforma induzível da óxido nítrico sintetase
I/R	isquemia seguida de reperfusão
JNK	quinase regulada pela sinalização extracelular
K ⁺	íon potássio
LPS	lipopolissacarídeo
MAP	proteína ativada por mitógeno
MAPK	MAP quinase
MAPKAP-K2	quinase ativada a jusante de p38
MAPKAP-K3	quinase ativada a jusante de p38
MAPKK	MAP quinase quinase

MAPKKK	MAP quinase quinase quinase
MDA	malondialdeído
MEF2A	fator de transcrição (<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>)
MEK 1/2	isoforma de MAPKK
MK	(MAPKAPK) proteína quinase ativada por MAPK
MK2	MK ativada por p38
MK3	MK ativada por p38
MKP-1	fosfatase que desativa ERK 1/2 (CL-100)
MKP-3	fosfatase que desativa ERK 1/2 (Pyst 1)
MSK1	quinase ativada a jusante de ERK 1/2 e p38
MSK2	quinase ativada a jusante de ERK 1/2 e p38
Na ⁺	íon sódio
NADPH	dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato
NF-κB	fator de transcrição NF-κB
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
OH ⁻	radical hidroxil
O ₂ ⁻	superóxido
p38	quinase regulada pela sinalização extracelular
p44/42	ERK1/2
p53	fator de transcrição p53
PAF	fator de agregação plaquetária
PD98059	inibidor de ERK 1/2
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PECO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono no ar expirado
PMN	polimorfonucleares
PTB	domínio de ligação de fosfotirosina
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
Raf	proteína capaz de fosforilar MEKs
Raf-1	isoforma de Raf
Ras	proteína da superfamília das proteínas G
Rho	proteína da superfamília das proteínas G
RLO	radicais livres de oxigênio

RSK	quinase ativada a jusante de ERK 1/2
RTK	receptor tirosina quinase
Sap	fator de transcrição (SRF accessory protein 1)
Shc	proteína de adaptação
SH2	domínio de homologia 2 Src
SH3	domínio de homologia 3 Src
Sos	<i>son of sevenless</i> (proteína de adaptação)
Src	proteína tirosina quinase
Tau	proteína microtubular
Thr	treonina
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TXA ₂	tromboxano A 2
Tyr	tirosina
XD	xantina desidrogenase
XO	xantina oxidase

RESUMO

A obstrução mecânica de vasos sanguíneos que irrigam o intestino leva à isquemia, com redução na oxigenação e perfusão teciduais. Se o fluxo sanguíneo oxigenado retorna aos tecidos bruscamente antes da morte celular, ocorre a chamada injúria de reperfusão, a qual pode ser iniciada por vários mecanismos, levando a uma resposta inflamatória. A injúria de isquemia e reperfusão (I/R) tem sido amplamente associada à necrose celular, apesar de um tipo bioquímico e morfológico distinto de morte celular, chamada de apoptose, também esteja envolvida. Tais processos são mediados por moléculas de sinalização na superfície das células, as quais levam a mudanças na expressão dos genes. Na maioria das células, as MAP (*Mitogen Activated Protein*) quinases (MAPK), as quais são parte de um grupo de enzimas citoplasmáticas, transmitem os sinais mitogênicos e de diferenciação. Três MAPK que foram identificadas em células de mamíferos participam do mecanismo de sinalização: ERK, p38 e JNK. As MAPK p38 e JNK ativadas normalmente estão associadas à apoptose, enquanto ERK 1/2 (P44/42) ativada tem função de inibição da apoptose. Com o propósito de minimizar a injúria de reperfusão após o transplante de fígado, a solução de *Carolina Rinse* (CRS) foi desenvolvida pela Universidade da Carolina do Norte nos EUA. Essa solução tem sido utilizada para minimizar os efeitos da I/R em intestino de eqüinos, mas pouco se sabe do seu possível mecanismo de ação protetora. O presente estudo objetivou investigar os efeitos do uso tópico e intraluminal da CRS na injúria de I/R e no perfil de ativação das MAPK p38 e ERK 1/2 no jejuno de coelhos. Quinze coelhos da raça Nova Zelândia foram alocados em três grupos: Instrumentado (A), Isquemia e reperfusão (B) e CRS (C). Os grupos B e C foram submetidos a uma hora de isquemia e duas horas de reperfusão de jejuno. No grupo C, dez minutos antes da reperfusão, o lumen do segmento foi preenchido com CRS e o mesmo foi imerso em CRS até o início da reperfusão. Mudanças como degeneração, necrose, edema, hemorragia, infiltrado e marginação de PMN não foram significativamente diferentes entre os grupos B e C, o que mostra que o uso tópico e intraluminal da CRS não atenuou os efeitos deletérios da I/R no intestino delgado de coelhos. A I/R estimulou a fosforilação das MAPK p44/42 e p38 em algumas camadas do jejuno. A ativação progressiva de p44/42 ocorreu principalmente nas criptas de Lieberkühn e nas camadas musculares circular e longitudinal, enquanto a MAPK p38 foi ativada principalmente no plexo mioentérico e em ambas as camadas musculares. Todas as camadas que responderam ao insulto da I/R com aumento da ativação de ERK 1/2 e p38, em todos os grupos, apresentaram baixos níveis basais de fosforilação, quando comparados àquelas que não responderam ao insulto. Os resultados desse estudo indicam que o uso tópico e intraluminal da CRS não interfere no perfil de ativação de ERK 1/2 e p38 no jejuno de coelhos submetidos à I/R.

Palavras-chave: intestino delgado, MAPK, necrose.

ABSTRACT

Mechanic obstruction of blood vessels that irrigate the intestine leads to ischemia and intense reduction of oxygenation and tissue perfusion. If oxygenated blood flow returns abruptly to tissues before cellular death reperfusion injury occurs; this can be initiated by several mechanisms resulting in inflammatory response. Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury has been widely associated to cell necrosis, although another distinct biochemical and morphological type of cell death, called apoptosis, is involved. Such conditions are mediated by signaling molecules in cellular surface, which lead to long term changes in gene expression. In the majority of cells, MAP (Mitogen Activated Protein) kinases (MAPK), which are part of a group of cytoplasmic enzymes, will transmit mitogenic and cell differentiation signs. Three MAPK that have been identified in mammalian cells participate in the signaling pathway: ERK, p38 and JNK. Activated p38 and JNK are usually related to apoptosis, while activated ERK 1/2 (P44/42) have a protection function inhibiting apoptosis. With the purpose of minimizing reperfusion injury after liver transplant, Carolina Rinse Solution (CRS) was designed by North Carolina University, USA. Although this solution has been used in horses to attenuate I/R injury in horse intestine, little is known about the eventual tissue protection mechanism. The present study aimed to investigate the effects of topical and intraluminal CRS in I/R injury, and the activation profile of p38 and ERK 1/2 MAPK, in rabbit jejunum. Fifteen New Zealand rabbits were allocated to three groups: Sham-operated (A), Ischemia and reperfusion (B) and CRS (C). Groups B and C were subjected to one hour of jejunal ischemia and two hours of reperfusion. In group C, ten minutes prior to reperfusion, the bowel lumen was filled with CRS, and the segment was immersed in CRS until reperfusion onset. Changes such as degeneration, necrosis, edema, hemorrhage, PMN infiltration and margination were not significantly different between groups B and C, showing that topical and intraluminal CRS did not attenuate deleterious effects of I/R in small intestine of rabbits. I/R stimulated the phosphorylation of p44/42 MAPK and p38 MAPK pathways in some layers of jejunum. Progressive activation of p44/42 MAPK was chiefly localized to the crypts of Lieberkühn, circular and longitudinal muscle layers, whereas p38 MAPK was prominently activated in myenteric plexus and both muscle layers. All layers that did respond to I/R insult with activation increase of ERK 1/2 and p38, in all groups, showed low baseline phosphorylation levels as compared to those that did not react to the insult. The results of this work indicate that topical and intraluminal CRS does not interfere in ERK 1/2 and p38 activation profile in rabbit jejunum subjected to I/R.

Key-words: small intestine, MAPK, necrosis.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 Introdução

A obstrução mecânica de vasos sanguíneos que irrigam o intestino leva à isquemia e intensa redução na oxigenação e perfusão teciduais (MOORE et al., 1995). Se o fluxo sanguíneo oxigenado retorna bruscamente aos tecidos antes da morte celular, ocorre a chamada injúria de reperfusão, a qual pode ser iniciada por vários mecanismos, levando a uma resposta inflamatória (WHITE, 2001). A reperfusão tecidual contribui para a formação de lesão e morte celular devido à peroxidação lipídica das membranas celulares que ocorre em resposta ao acúmulo de radicais livres de oxigênio e outras substâncias citotóxicas (SCHOENBERG & BEGER, 1993).

O conceito de injúria de reperfusão se baseia em achados experimentais, nos quais a lesão de mucosa se intensifica após a reperfusão da área isquêmica (ZIMMERMAN & GRANGER, 1990). Entre as alterações intestinais que ocorrem durante a reperfusão, após isquemia experimental, estão: aumento da permeabilidade microvascular, desprendimento das células da mucosa, turgidez das células endoteliais, infiltração de neutrófilos, perda da camada mesotelial da serosa e dilatação linfática (MOORE et al., 1994).

Muitas opções de tratamento com mediadores farmacológicos visam alterar os efeitos de uma parte dos mecanismos da reperfusão e mostram resultados variáveis. O objetivo da terapia é cessar os eventos bioquímicos, o mais cedo possível, na cascata da reperfusão (ROWE & WHITE, 2002). Com o intuito de minimizar a injúria de reperfusão após o transplante de fígado em ratos, a solução de Carolina Rinse (CRS) foi desenvolvida na Universidade da Carolina do Norte, EUA (CURRIN et al., 1990) e se mostrou efetiva em casos de uso tópico e intraluminal no jejuno isquêmico de equinos (DABAREINER et al., 2005).

Existem grandes evidências de que as MAP (*Mitogen Activated Protein*) quinases são ativadas durante a isquemia e/ou reperfusão e podem contribuir com mudanças estruturais e funcionais do órgão afetado (ABE et al., 2000).

A injúria de isquemia e reperfusão intestinal é descrita experimentalmente em diversas espécies animais, a exemplo do cão (NEZU et al., 2008), gato (YOUNES et al., 1984), rato (IKEDA et al., 1998) e coelho (BRETZ et al., 2010). Nos equinos, este processo representa uma condição comum de abdome agudo (MOORE, 1997). A obstrução do intestino delgado por estrangulamento constitui uma das principais causas de óbito nesta espécie (WHITE et al., 1980).

O coelho tem sido utilizado como modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal em diversos estudos (TOENS et al., 2006; BRETZ et al., 2010; GOMES et al., 2010; TAHA et al., 2010). A espécie foi utilizada no presente estudo devido à sua anatomia do intestino delgado: amplo, acessível e com um único suprimento sanguíneo mesentérico (O'MAHONY et al., 2007).

Este trabalho traz novas informações a respeito das atividades das MAP quinases ERK 1/2 e p38 no intestino delgado de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão experimental, bem como dos efeitos da CRS no perfil de ativação dessas enzimas e nas alterações histopatológicas das camadas do jejuno. Estes resultados poderão contribuir para o entendimento do mecanismo celular das doenças intestinais isquêmicas.

2 Caracterização do problema

2.1 Morfologia e função do intestino delgado

O intestino delgado dos coelhos está anatomicamente dividido em três segmentos: duodeno, jejuno e íleo. O jejuno é o mais longo dos segmentos. A maior parte do intestino delgado recebe suprimento sanguíneo das artérias jejunais que se originam da artéria mesentérica cranial (MACHADO et al., 2008).

A divisão histológica do intestino delgado dos coelhos (Figura 1), bem como em outras espécies de mamíferos, é formada por mucosa, submucosa, musculares circular e longitudinal (interna e externa respectivamente) e serosa (BREWER, 2006). A mucosa do jejuno é constituída por células epiteliais colunares alinhadas em vilosidades (projeções alongadas), que conferem uma

maior superfície de contato à mesma (DORAN et al., 1992). As chamadas criptas de Lieberkühn ou glândulas intestinais são invaginações tubulares localizadas na base das vilosidades. A camada muscular longitudinal possui um plexo mioentérico evidente no jejuno. A serosa consiste em uma camada de tecido conectivo frouxo (PFEIFFER & MACPHERSON, 1990).

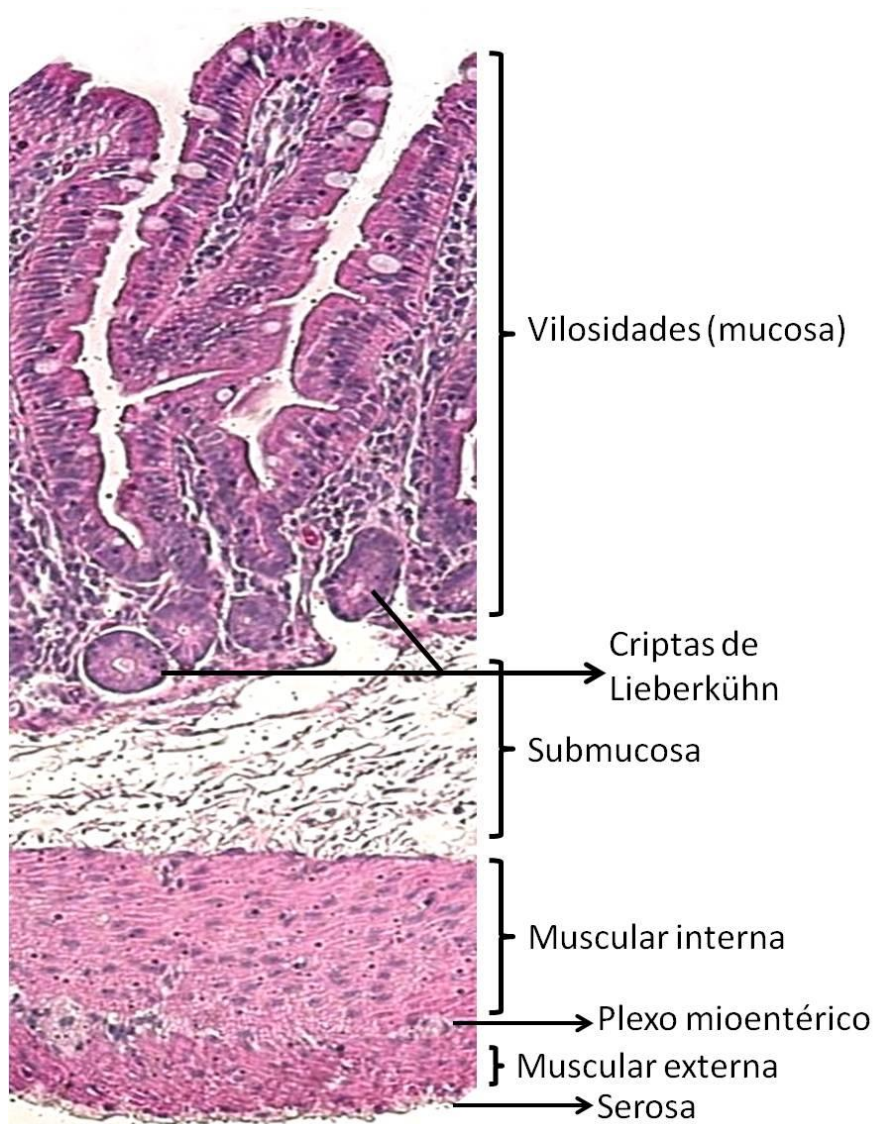


Figura 1-Fotomicrografia de um segmento isolado de jejuno de coelho mostrando a divisão histológica em camadas. H&E, 100X.

A capacidade de absorção do intestino delgado é importante no transporte de líquidos e ingesta do lúmen até o sistema linfático ou vascular, para posterior processamento. O intestino delgado é considerado um órgão bastante ativo metabolicamente, mas sua função mais óbvia talvez seja o trânsito aboral de material ingerido e secretado, desde o estômago até o ceco e cólon maior (DORAN et al., 1992).

2.2 Isquemia intestinal

No intestino dos mamíferos a isquemia resulta de fatores locais (obstrução vascular mecânica) ou sistêmicos (hipovolemia, hipotensão, sepse) (BARIE, 1999). A obstrução mecânica de vasos sanguíneos que irrigam o intestino leva à isquemia e acentuada redução na oxigenação e perfusão teciduais (MOORE et al., 1995).

Na obstrução estrangulatória, representada por vólvulos, intussuscepções, torções e hérnias, ocorre um comprometimento vascular resultante de oclusões venosas ou arteriovenosas (ALLEN & TYLER, 1990). Quando há obstrução do lúmen com oclusão venosa apenas, o processo é definido como estrangulamento hemorrágico. Neste caso, o fluxo arterial continua levando a um aumento da pressão hidrostática venosa e capilar (TEDDER et al., 1995). Minutos após o estrangulamento, o segmento envolvido e o mesentério correspondente se tornam bastante congestos, enquanto veias e vênulas se distendem (ALLEN & TYLER, 1990).

À medida que ocorre depleção do oxigênio, o segmento passa a ter aparência negra e avermelhada. O endotélio vascular fica mais permeável, permitindo a difusão de plasma para os tecidos. Com isso, o transudato logo se transforma em exsudato, já que há extravasamento de fibrinogênio e migração de células inflamatórias ao local. Após algumas horas, a degeneração do endotélio torna-se tão extensa, que o sangue extravasa para os tecidos e eventualmente, para o lúmen do segmento envolvido (ALLEN & TYLER, 1990), o que caracteriza o fenômeno de estrangulamento hemorrágico. O resultado deste processo é a formação de edema e hemorragia, que são facilmente observados

macroscopicamente. Em um último estágio, a hipóxia e a isquemia desenvolvem-se rapidamente e podem ocasionar necrose do segmento envolvido e endotoxemia (TEDDER et al., 1995).

Quando ocorre obstrução do lúmen acompanhada por oclusão arterial e venosa simultaneamente o fenômeno é denominado estrangulamento isquêmico (SNYDER, 1989). Neste caso, não é comum o desenvolvimento de hemorragia ou edema. A serosa apresenta-se pálida, acinzentada e mosqueada. A mucosa varia de uma aparência normal até um vermelho escuro (TEDDER et al., 1995).

A distensão do intestino delgado proximal a uma obstrução também provoca lesão. À medida que a pressão intraluminal aumenta, os capilares e vênulas são comprimidos, reduzindo a capacitância vascular. Ocorre redução subsequente da perfusão e acúmulo de líquidos intersticiais, o que intensifica o comprometimento vascular (DABAREINER et al., 2001b).

É importante ressaltar que durante os estágios iniciais de estrangulamento hemorrágico, embora haja alterações bastante visíveis na coloração das alças intestinais, o grau de lesão da mucosa está reduzido, se comparado às circunstâncias em que há estrangulamento isquêmico. Contraditoriamente, lesões causadas pelo estrangulamento isquêmico não parecem ser graves e o segmento afetado pode retomar a coloração rósea e ter motilidade durante a reperfusão, apesar de muitas vezes apresentar lesões acentuadas (BLIKSLAGER, 2003).

As células em geral possuem capacidade de aumentar a extração de oxigênio caso ocorra redução do fluxo sanguíneo; desta forma continuam a exercer suas funções com reservas de energia. No entanto, se o fluxo sanguíneo é reduzido a níveis inferiores aos necessários para manter a viabilidade celular, ou se o consumo de oxigênio aumenta, o metabolismo é comprometido e ocorrem mudanças na estrutura e funções celulares. Diferentes células do intestino possuem demandas metabólicas e susceptibilidade à isquemia também diferentes. A mucosa do intestino é altamente dependente de energia; caso haja redução no suprimento sanguíneo e oxigenação, pode ocorrer rápida formação de lesão e morte (MOORE et al., 1995).

O processo anteriormente descrito pode ocorrer tanto com o estrangulamento venoso, como arteriovenoso. O epitélio que reveste as vilosidades se desprende de sua membrana basal, enquanto que as células epiteliais permanecem ligadas umas às outras, se desprendendo em grupos. À medida que a hipóxia continua, as alterações degenerativas se intensificam e dentro de quatro a cinco horas ocorre completa necrose do epitélio da mucosa. Após seis ou sete horas, os efeitos da hipóxia já se estenderam pela camada muscular externa, podendo levar à perfuração do segmento (ALLEN & TYLER, 1990).

As vilosidades intestinais possuem uma arteríola central que se ramifica próximo ao topo das mesmas, drenando para as vênulas periféricas (DART et al., 1992). Esta arquitetura vascular promove um mecanismo de troca contracorrente, onde o oxigênio se difunde desde a arteríola central para os tecidos e vênulas adjacentes periféricos. Quando o fluxo arterial está reduzido, nos estágios iniciais de estrangulamento, as extremidades das vilosidades tornam-se progressivamente hipóxicas, resultando em lesão epitelial. Portanto, a lesão isquêmica de mucosa leva a um desprendimento tempo-dependente do epitélio, desde as extremidades das vilosidades em direção às criptas (SHEPHERD & GRANGER, 2001). Entretanto, um estudo em ratos demonstrou que a maior sensibilidade dos enterócitos do topo das vilosidades à isquemia é dependente, na verdade, do seu estado de diferenciação (HINNEBUSCH et al., 2002).

A perda da barreira da mucosa intestinal permite que bactérias e endotoxinas atinjam a cavidade abdominal, provocando um aumento do número de neutrófilos no líquido peritoneal. As alterações isquêmicas levam à necrose, a menos que o fluxo sanguíneo retorne. Em caso de necrose extensa, bactérias podem ser encontradas na cavidade peritoneal ou no interior de neutrófilos e o líquido peritoneal pode tornar-se sero-sanguinolento (WHITE, 2003).

De acordo com CHIU et al. (1970), as mudanças provocadas pela isquemia na mucosa metabolicamente ativa podem ser classificadas, com base na severidade das lesões, em Grau 0 (mucosa normal), Grau I (desenvolvimento de um espaço subepitelial chamado de espaço de Gruenhagen normalmente no topo das vilosidades e congestão de capilares), Grau II (extensão do espaço

subepitelial com desprendimento moderado da camada epitelial em relação à lâmina própria), Grau III (desprendimento massivo do epitélio em direção à base das vilosidades; alguns topos das vilosidades podem estar descobertos), Grau IV (vilosidades descobertas com exposição da lâmina própria e capilares dilatados expostos; aumento da celularidade da lâmina própria pode ser notada) e Grau V (desintegração da lâmina própria, hemorragia e ulceração).

2.3 Reperusão intestinal

Se o fluxo sanguíneo oxigenado retorna aos tecidos antes da morte celular, inúmeros eventos bioquímicos ocorrem imediatamente durante a reperusão tecidual. O resultado deste evento é chamado de injúria de reperusão, a qual pode ser iniciada por vários mecanismos, levando a uma resposta inflamatória (WHITE, 2001). É um conceito que parece contraditório, já que a lesão isquêmica é resultante da ausência de fluxo de sangue oxigenado (ZIMMERMAN & GRANGER, 1990; KURTEL et al., 1991; KUBES et al., 1992). Embora na maior parte dos casos esta injúria seja observada após uma isquemia parcial ou de baixo fluxo, a mesma também pode ocorrer após isquemia completa, a menos que o comprometimento celular seja tão acentuado que não permita mais que as células respondam à reperusão (PARKS et al., 1982). Apesar de ser essencial para prevenir a morte celular por anóxia, a reperusão tecidual produz um efeito paradoxal de agravamento das lesões pré-existentes (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988).

Mesmo diante de constantes investigações, os mecanismos envolvidos na injúria de reperusão intestinal ainda não estão completamente esclarecidos e existe uma carência de protocolos efetivos, clinicamente aplicáveis, na prevenção das lesões (LIU et al., 2009). Durante muito tempo prevaleceu a ideia de que o tratamento das desordens isquêmicas intestinais era apenas cirúrgico; a correção da causa e o restabelecimento circulatório, ou a ressecção das alças desvitalizadas, quando se julgava necessário, eram considerados suficientes (SHIRES, 1984). Em muitas situações, segmentos intestinais considerados aparentemente viáveis durante a intervenção cirúrgica necrosavam no período

pós-operatório. Esse problema era inicialmente atribuído às falhas de interpretação da intensidade das lesões teciduais durante a cirurgia (PARKS & GRANGER, 1986).

As células endoteliais são os iniciadores primários da injúria de reperfusão (WHITE, 2001). Essas células são metabolicamente ativas e têm uma função especializada na regulação da pressão arterial, permeabilidade e tônus vasculares, aderência celular inflamatória, coagulação e agregação plaquetária (PALOMBO et al., 1991). O endotélio sintetiza e libera vários mediadores químicos (KATUSIC & SHEPHERD, 1991). Quando ativadas ou lesionadas, as células endoteliais se tornam túrgidas, têm sua morfologia alterada e ocorre perda subsequente das íntimas junções intercelulares (aumento da permeabilidade capilar). Em seguida, ocorre um extravasamento de eritrócitos, neutrófilos (DABAREINER et al., 1995), líquidos e proteínas para o interstício, promovendo um aumento da pressão intersticial e colapso capilar (DABAREINER et al., 1995; WHITE, 2001). Este fato favorece a redução da perfusão sanguínea do tecido e resulta no fenômeno de não reperfusão (*no reflow*) e posterior isquemia. Esta é uma razão que explica a redução no fluxo sanguíneo do intestino após a resposta hiperêmica inicial (MOORE et al., 1995).

As células que sofreram isquemia previamente são capazes de gerar metabólitos tóxicos reativos de oxigênio e tendem a liberar proteínas celulares em consequência da perda da integridade da membrana, o que pode funcionar como um sinal de alerta e ativar o sistema imunológico. Como resultado da resposta inflamatória ocorre a expressão local de moléculas de adesão, mediadores pró-inflamatórios, ativação de neutrófilos e do sistema complemento, que são mediadores centrais da injúria de isquemia e reperfusão (I/R). Este estado pró-inflamatório aumenta a vulnerabilidade tecidual às lesões subsequentes, resultando no desencadeamento e amplificação da resposta inflamatória, embora esta reação tenha também um componente benéfico na remoção de células danificadas (DERIKX et al., 2008).

Em condições normais a adenosina tri-fosfato (ATP) é metabolizada em adenosina, inosina e hipoxantina. A xantina desidrogenase (XD), uma enzima encontrada nas células endoteliais, converte a hipoxantina em xantina e ácido úrico que posteriormente é eliminado pelos rins (Figura 2). Durante a isquemia, a

ausência de oxigênio resulta em glicólise anaeróbica, que promove o acúmulo de ácido láctico no interior das células e, conseqüentemente, acidose intracelular, que por sua vez inibe a produção de ATP. Com isso, a célula passa a metabolizar as reservas de ATP intracelulares pré-existentes (COHEN, 1989). A depleção de ATP leva a um aumento das concentrações de hipoxantina no interior da célula (DABAREINER et al., 2005). A falta de energia disponível provoca redução na função da bomba de Na^+ e K^+ , que é importante na manutenção do balanço adequado de íons intra e extracelulares. A falha no funcionamento dessa bomba acarreta um influxo de cálcio para o interior das células. O aumento do cálcio inicia a conversão de XD em xantina oxidase (XO) por uma protease chamada calpaína cálcio-dependente (COHEN, 1989). A conversão de XD em XO durante a I/R foi previamente documentada no intestino delgado de equinos (DABAREINER et al., 2005).

A hipoxantina também é um substrato para XO. Durante a reperusão, a reintrodução de oxigênio catalisa a oxidação da hipoxantina acumulada pela XO em xantina e ácido úrico, mas desta vez com formação de um radical livre superóxido (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988), conforme esquematizado na Figura 2. Os radicais superóxido formados durante a redução da hipoxantina têm sido implicados nas mudanças de permeabilidade observadas após a I/R no intestino delgado de felinos (DABAREINER et al., 2005). Existem possibilidades de que a produção de radicais livres de oxigênio (RLO), por si só, pode ser suficiente para causar danos teciduais no intestino delgado (MOORE et al., 1995).

O aumento de cálcio no interior das células também promove a elevação expressiva na atividade da fosfolipase A2, enzima que catalisa a hidrólise do ácido graxo do fosfolípideo de membrana, liberando ácido araquidônico (OTAMIRI et al., 1987). Este fato acentua a degradação da membrana celular fosfolipídica e promove o agravamento das alterações teciduais por meio do aumento na produção de lisofosfatidilcolina e do fator de agregação plaquetária (PAF) (OTAMIRI & TAGESSON, 1989). Além disso, o ácido araquidônico liberado pela ação da fosfolipase A2 é metabolizado durante a reperusão pela enzima ciclooxigenase, gerando prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina e pela enzima lipoxigenase, dando origem aos leucotrienos. Estes eicosanóides (moléculas derivadas de ácidos graxos) produzem efeitos

vasoativos resultando em vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, estímulo da agregação plaquetária e quimiotaxia para neutrófilos (COTRAN et al., 1994; MOORE et al., 1995).

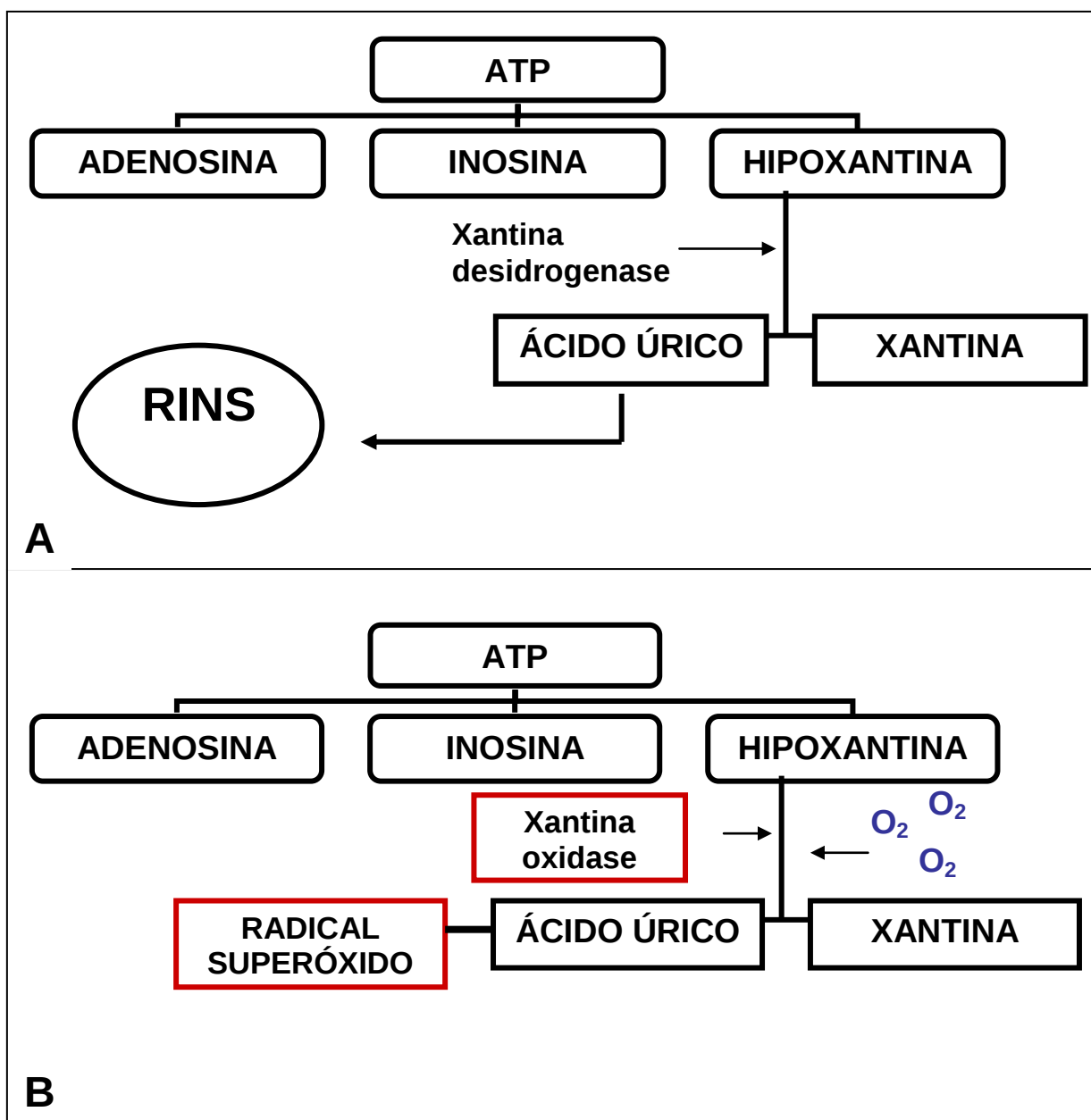


Figura 2- Representação esquemática da conversão da hipoxantina em xantina e ácido úrico. (A) Conversão realizada pela enzima xantina desidrogenase em condições fisiológicas. (B) Quando há reperfusão ocorre conversão realizada pela enzima xantina oxidase com formação de um radical superóxido; reação catalisada pelo oxigênio.

A ação dos eicosanóides, do PAF e a formação de radicais livres estimulam as células endoteliais a produzirem citocinas, as quais promovem migração, ativação e acúmulo de neutrófilos no tecido pós-isquêmico. A adesão destas células ao endotélio vascular na microcirculação dificulta o fluxo sanguíneo local (ZIMMERMAN & GRANGER, 1992; GRANGER & KORTHUIS, 1995). Uma vez ativados, os neutrófilos degranulam e liberam radicais livres, proteases, ânion superóxido, citocinas e ácido hipocloroso que podem provocar lesões vasculares e de mucosa (KUBES et al., 1992; MOORE et al., 1995).

A migração, o acúmulo e a ativação de neutrófilos podem aumentar a produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), os quais têm importante papel na patogenia das injúrias de I/R, além de poderem causar injúrias oxidativas mediadas por RLO. O TNF- α e a IL-6 são capazes de induzir diretamente um dano tecidual, mas também são potentes ativadores de neutrófilos (ROWE & WHITE, 2002). Tais observações sugerem uma relação entre os RLO e a migração de neutrófilos como uma importante causa para os danos da mucosa (GRISHAM et al., 1986).

A resposta dos neutrófilos é observada no intestino comprometido pela isquemia, bem como no intestino adjacente ou distante da injúria (GERARD et al., 1999). Quando os neutrófilos e seus produtos enzimáticos são sequestrados no tecido intestinal, além de levar a um aumento da permeabilidade microvascular, perivascular e formação de edema, outros órgãos podem ser afetados causando, por exemplo, edema pulmonar (LIU et al., 2009).

As proteases, enzimas que decompõem ligações peptídicas, podem causar danos às células e estão envolvidas na injúria de reperfusão. Os leucócitos granulócitos contêm algumas serina-proteases que são liberadas durante a fagocitose, entre as quais, a elastase e a catepsina-G (MOORE et al., 1995). As serina-proteases catalisam a degradação de proteínas ou polipeptídeos. Os lisossomas, pequenas organelas intracelulares encontrados no citoplasma da maioria das células, também são fontes de proteases que degradam ou digerem os debris celulares. Existem inibidores de proteases endógenos que normalmente protegem os tecidos contra os efeitos dessas enzimas (BORGSTROM & HAGLUND, 1989). A injúria de mucosa que ocorre durante a reperfusão foi evitada experimentalmente com inibidores de proteases

no intestino de felinos (PARKS et al., 1985). Os granulócitos e lisossomas são as fontes mais importantes de proteases no intestino grosso (MOORE et al., 1995) e os lisossomas no pâncreas são importantes fontes de proteases no intestino delgado (PARKS et al., 1985). As endoproteases pancreáticas podem manter alguma atividade enzimática quando se ligam à mucosa intestinal, contribuindo para a destruição proteolítica das células da mucosa (MOORE et al., 1995).

A elastase liberada pelos neutrófilos ativados degrada as barreiras intercelulares das células endoteliais, permitindo a migração de neutrófilos da microvasculatura para o interstício (MOORE et al., 1995). Quando os neutrófilos aderem ao endotélio e migram através deste, os mesmos provocam injúria e aumentam a permeabilidade vascular. Portanto, a migração de neutrófilos dos capilares ou vênulas para o interstício é precedida pelas aderências ao endotélio. Esta importante etapa pode ser prevenida com anticorpos monoclonais direcionados ao receptor das proteínas de adesão (HERNANDEZ et al., 1987). Estudos realizados no intestino de felinos têm demonstrado que o infiltrado de neutrófilos durante a reperfusão pode ser evitado com um pré-tratamento com alopurinol (inibe a xantina oxidase), superóxido dismutase (catalisa a conversão do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio) (GRISHAM et al., 1986), catalase (catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água) (ZIMMERMAN et al., 1990a) e deferoxamina (inibe a conversão de O_2^- em OH^-) (ZIMMERMAN et al., 1990b). Além disso, os danos endoteliais também podem resultar na formação de trombos intravasculares (DABAREINER et al., 2005).

A produção de radicais livres superóxido pelos neutrófilos se dá via sistema dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato (NADPH) (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988), que catalisa a redução do oxigênio ao ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A produção destes componentes oxidantes é o principal mecanismo pelo qual os neutrófilos fagocitam e, subsequentemente, destroem os micro-organismos (KLEBANOFF, 1988).

Em condições normais os RLO são produzidos durante o metabolismo celular e podem lesar células. Entretanto, agentes antioxidantes normalmente presentes nas células protegem as mesmas contra a formação das lesões. Os radicais superóxido geralmente são convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase endógena (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988).

O H_2O_2 é eliminado por intermédio das enzimas catalase e glutathione peroxidase. Além desses mecanismos, o organismo dispõe de outros sistemas antioxidantes, dos quais participam o ácido ascórbico e o alfa-tocoferol. Estas vitaminas reagem com os radicais livres formando substâncias inativas como o ácido dehidroascórbico e tocoferol-semiquinonas, respectivamente (COTRAN et al., 1994).

Em casos de reperfusão ocorre uma sobrecarga dos mecanismos endógenos, o que permite que os radicais livres e seus metabólitos causem lesão celular. Os RLO mais importantes são o superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$). O H_2O_2 , apesar de não ser considerado um radical livre, participa dos processos de síntese e eliminação do O_2^- e do $\text{OH}^\cdot$, além de possuir potencial nocivo; por isso é estudado conjuntamente com os RLO (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988; COTRAN et al., 1994; HALLIWELL, 1997).

Embora em condições normais os radicais superóxido, por não serem consideravelmente lipossolúveis, não causem danos diretamente aos tecidos, estes desencadeiam a liberação de fatores quimiotáticos como o leucotrieno B_4 e o fator ativador de plaquetas (MOORE, 1997). Os fatores quimiotáticos, por sua vez, têm a capacidade de induzir a produção de $\text{TNF-}\alpha$, outro importante mediador da inflamação (GRANGER et al., 1986b; GRISHAM et al., 1986).

Os RLO provocam danos estruturais aos tecidos por meio da peroxidação lipídica das membranas celulares e organelas intracelulares e oxidação de proteínas, resultando em lise celular e produção de mediadores fosfolipídicos pela ativação da fosfolipase A2 (MOORE et al., 1995). Além disso, as enzimas celulares são inativadas e as fitas de DNA são quebradas devido à oxidação (ERNSTER, 1988). Os danos peroxidativos lipídicos à membrana celular danificam a integridade da célula, levando à vacuolização, edema e eventual morte das mesmas (ROMSON et al., 1983).

Os bioprodutos da peroxidação lipídica da membrana celular: malondialdeído (MDA) e dienos conjugados têm sido detectados na injúria de reperfusão em gatos, ratos e cães (GRANGER et al., 1986b; UEDA et al., 1989; LANTZ et al., 1992). O MDA é utilizado como indicador de peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). Tanto o MDA quanto os dienos conjugados aumentam significativamente no jejuno durante a reperfusão, o que é condizente

com os danos às membranas lipídicas pelo processo oxidativo observados durante a reperfusão (KOOREMAN et al., 1998).

A eliminação rápida do O_2^- e do H_2O_2 evita a formação do OH^- , que é considerado bastante nocivo devido à sua extrema reatividade e à falta de um sistema enzimático específico para sua eliminação. Este radical livre pode ser formado a partir do O_2^- e H_2O_2 pela reação de *Haber-Weiss* ou a partir do H_2O_2 através da reação de *Fenton*, que ocorrem na presença de íons ferro (Fe^{++}) e cobre (Cu^+) (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988; COTRAN et al., 1994). O equilíbrio entre a eliminação de RLO e sua produção é fundamental para manter a integridade dos tecidos. Quando há um desequilíbrio, os RLO desencadeiam um processo chamado de estresse oxidativo produzindo alterações teciduais (MCCORD, 1985; COTRAN et al., 1994).

Entre os radicais livres produzidos durante a isquemia e reperfusão, o óxido nítrico (NO) também exerce um papel importante. Em condições normais este é sintetizado pela L-arginina, por intermédio da NO sintase (NOS), a qual possui isoformas constitutivas (eNOS) e induzíveis (iNOS) (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). A produção excessiva de NO pela iNOS contribui para a fisiopatologia das lesões de reperfusão no intestino (CUZZOCREA et al., 2002). A produção de NO pela eNOS pode representar uma molécula protetora importante para o intestino delgado em casos de I/R. O óxido nítrico possui efeitos vasodilatadores benéficos no sistema microvascular mediante o relaxamento das células da musculatura vascular lisa, mas contraditoriamente pode estar envolvido na produção de radicais citotóxicos (CHAN et al., 1999). Não obstante, o óxido nítrico é benéfico como um modulador ou mensageiro, mas durante o estresse oxidativo pode ser potencialmente tóxico (SEKHON et al., 2003). Tecidos submetidos à isquemia e reperfusão podem sofrer redução nos níveis de NO devido à inativação da NOS e do próprio NO pelo superóxido produzido nesses tecidos (KUROSE et al., 1994). Além disso, a destruição das células endoteliais, que são fonte de NO, por radicais livres, também pode causar redução dos níveis de NO (ANDREWS et al., 1994).

As plaquetas são utilizadas pela microvasculatura pós-isquêmica logo após o início da reperfusão. Mesmo sendo anucleadas, estas podem gerar radicais livres, liberar mediadores pró-inflamatórios como tromboxano A_2 (TXA_2 -

mediador vasoativo e constritor do músculo liso, é um metabólito do ácido araquidônico), leucotrienos, serotonina, fator plaquetário-4 e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), além de modular a função leucocitária. Logo, o acúmulo de plaquetas na microvasculatura pode contribuir significativamente para a manifestação das lesões (MASSBERG et al., 1998).

Os mastócitos, assim como as reações induzidas por estes, parecem contribuir para o aumento da permeabilidade da mucosa durante a reperfusão, embora suas funções exatas ainda não tenham sido esclarecidas (ZHANG et al., 2004). Existem evidências de que os polimorfonucleares (PMN), entre outras células, exercem funções significativas na patogenia da injúria de reperfusão (MASSBERG et al., 1998).

2.4 Alterações morfológicas decorrentes da injúria de reperfusão no intestino delgado

Entre diversos órgãos, o intestino é provavelmente o mais sensível à injúria de isquemia e reperfusão (GRANGER et al., 1986a). A injúria de reperfusão resulta em dano celular e infiltrado inflamatório em todas as camadas do intestino delgado. A degeneração da mucosa é caracterizada por variados graus de desprendimento de células, formação de fissuras subepiteliais e vacuolização necrótica do epitélio absorptivo. Os achados comuns na mucosa da região da lesão incluem: dilatação das criptas, acúmulo extenso e multifocal de debris necróticos na superfície da lâmina própria, edema, congestão e dilatação dos capilares linfáticos. Esses achados também podem ser comuns em outras desordens inflamatórias do intestino (MESCHTER et al., 1986).

Em lesões estrangulatórias e obstrutivas grandes áreas de desprendimento de células epiteliais da mucosa podem ocorrer e progredir para necrose e desprendimento do epitélio. Um aumento significativo no infiltrado de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos na mucosa e submucosa tem sido demonstrado. Os neutrófilos podem alinhar-se nos vasos ou permanecer livres na lâmina própria em grandes números, enquanto eosinófilos e linfócitos podem formar uma linha espessa ao longo de cada lado da camada muscular da mucosa

e degranular. Mastócitos podem estar evidentes na junção da lâmina própria epitelial, nas fissuras subepiteliais da mucosa, em pequenos agregados, ou ao redor de capilares na submucosa. A serosa pode parecer congesta, espessa e moderadamente infiltrada com neutrófilos e macrófagos (MESCHTER et al., 1986).

Durante uma isquemia total em modelos experimentais, as células da mucosa do jejuno se separam da membrana basal (WHITE et al., 1980). Em casos de isquemia de baixo fluxo, a 20% do fluxo normal, uma perda similar da mucosa é caracterizada pelo desprendimento progressivo de células epiteliais e redução significativa no volume e área de superfície da mucosa (VATISTAS et al., 1998). Após a reperfusão de segmentos jejunais o edema de serosa, infiltrado de leucócitos e extravasamento de eritrócitos aumentam significativamente (DABAREINER et al., 2001a). Durante um período de reperfusão de uma a três horas, hemácias e leucócitos infiltram-se por todas as camadas do intestino, ocorre perda massiva de células epiteliais e aumento do volume da mucosa e serosa (VATISTAS et al., 1998).

O aumento da permeabilidade vascular leva à progressão dos danos ao endotélio e ampliação do volume da submucosa (DABAREINER et al., 1995). Mudanças estruturais, incluindo espessamento do endotélio, vacuolização e danos mitocondriais, têm sido observadas nos capilares da serosa de segmentos em reperfusão (DABAREINER et al., 2001a).

Os segmentos intestinais aborais e orais à lesão também apresentam injúria durante a reperfusão, o que é uma importante consideração quando avalia-se o intestino para a realização de ressecção e anastomose (GERARD et al., 1999). Os sítios intestinais proximais e distais à lesão primária apresentam acúmulos multifocais de debris necróticos na região subepitelial, vacuolização das células da mucosa, pequenos desprendimentos focais de células epiteliais, hiperemia, edema, desenvolvimento de espaços subepiteliais e acúmulos focais de hemossiderina no topo das vilosidades (MESCHTER et al., 1986). Um estudo investigou as características das injúrias intestinais nas áreas adjacentes à obstrução estrangulativa no intestino delgado de equinos e mostrou que houve injúria acentuada de mucosa às margens do íleo seccionado. A serosa proximal

ao jejuno seccionado apresentou evidências de hemorragia, edema e aumento significativo de neutrófilos (GERARD et al., 1999).

Apesar da gravidade das lesões da mucosa intestinal provocadas pela isquemia e reperfusão, após longos períodos de reperfusão ocorre a migração de células epiteliais para selar a membrana basal exposta, o que repara a perda da continuidade epitelial (BLIKSLAGER et al., 2007). Mudanças degenerativas podem ser observadas nos neurônios entéricos e algumas destas células são perdidas após a injúria de isquemia e reperfusão (RIVERA et al., 2009). Os neurônios que sobrevivem mostram evidências de danos por várias semanas, apesar do reparo rápido da mucosa (PONTELL et al., 2011).

Ainda não foram realizados muitos estudos a respeito dos danos provocados pela I/R nas camadas musculares do intestino delgado. Além disso, existem resultados conflitantes. Em um estudo não houve mudanças significativas nas camadas musculares após uma hora de isquemia e até dez semanas de reperfusão no intestino delgado de ratos (LINDESTROM & EKBLAD, 2004). Entretanto, foi relatado recentemente que aproximadamente 10% das células musculares apresentam apoptose seis horas e 12 horas após isquemia de uma hora de duração, no intestino delgado de suínos (MEI et al., 2009).

2.5 Apoptose na isquemia e reperfusão intestinal

A necrose tem sido atribuída como a forma de morte celular resultante da injúria de isquemia e reperfusão. Entretanto, pesquisas indicam que uma outra forma de morte celular conhecida como apoptose estaria envolvida (NODA et al., 1998). A necrose é caracterizada por mudanças resultantes da falta de oxigenação, enquanto a apoptose resulta de uma sinalização intracelular que inicia a transcrição de genes específicos. A necrose normalmente atinge grupos de células ou órgãos inteiros, enquanto a apoptose atinge células individuais de um tipo altamente específico (JONES, 1997). Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo ativo de autodestruição celular caracterizada por mudanças morfológicas como condensação da cromatina, diminuição do tamanho da célula com organelas permanecendo intactas e eventual fragmentação do núcleo e

citoplasma para formar os corpos apoptóticos (FU et al., 1997; CHANG et al., 2002).

No trato gastrointestinal, a apoptose pode ser associada à manutenção da homeostase, ao desprendimento de células, desde o topo das vilosidades do intestino delgado, à patogênese da doença inflamatória intestinal e aos danos induzidos pela radiação (SUN et al., 1998). Acredita-se que a apoptose tenha um papel complementar e oposto à mitose na regulação das populações de células nos animais (KERR et al., 1972).

A apoptose foi induzida experimentalmente no íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão (NODA et al., 1998). Um experimento mostrou que equinos acometidos por estrangulamento do intestino delgado apresentam grande número de células apoptóticas, possivelmente devido à lesão isquêmica e inflamação subsequente (ROWE et al., 2003). Embora a apoptose que ocorre como parte da função intestinal normal não leve ao desenvolvimento de um processo inflamatório, a apoptose excessiva induzida experimentalmente provoca resposta inflamatória (SUN et al., 1998).

Estudos prévios demonstraram que curtos períodos de isquemia renal (cinco minutos) resultaram no aparecimento de corpos apoptóticos durante a reperfusão, com mínima necrose. Elevando-se o tempo de isquemia, as mortes apoptótica e necrótica tornaram-se identicamente proeminentes (SCHUMER et al., 1992). A oclusão da artéria mesentérica superior com reperfusão subsequente causou lesão e apoptose na mucosa do intestino delgado de ratos, em índices superiores aos da necrose (IKEDA et al., 1998; NODA et al., 1998). A apoptose é considerada um componente importante da lesão de isquemia e reperfusão intestinal em equinos (ABREU et al., 2007) e é a principal forma de morte celular encontrada após a reperfusão do intestino de ratos submetidos ao isotransplante (SHAH et al., 1997). A perda da interação entre as células epiteliais e a matriz extracelular pode ter um importante papel na indução da apoptose em enterócitos desprendidos (DERIKX et al., 2008).

O estímulo pró-apoptótico vai induzir as células à apoptose. Contudo, a concentração de ATP intracelular é um fator determinante nas reações que causam apoptose. Uma redução nos níveis de ATP facilitará a ocorrência de

necrose em relação à apoptose, e um aumento do ATP resultante dos substratos glicolíticos promove o efeito oposto (LEIST et al., 1997).

A porcentagem de fragmentação de DNA aumenta durante a isquemia e chega ao limite máximo após uma hora de reperfusão. A magnitude da fragmentação do DNA é diretamente proporcional à duração do insulto isquêmico, com uma porcentagem significativamente maior de fragmentação de DNA após 60 minutos de isquemia, comparado a 15 minutos. Devido ao fato da máxima fragmentação ocorrer após uma hora de reperfusão, seguida de um retorno aos valores basais após seis horas, observou-se que a indução da apoptose intestinal e recuperação da mucosa são processos rápidos. Parece haver um aumento tempo-dependente dos fatores que promovem a apoptose durante a isquemia e fases iniciais de reperfusão, mas os mesmos reduzem rapidamente com a reperfusão prolongada. Também parece haver uma indução simultânea dos inibidores de apoptose, bem como promotores de reparo tecidual durante a fase avançada da reperfusão (NODA et al., 1998).

O mecanismo exato para a indução de apoptose não é conhecido. Entretanto, estudos têm mostrado que os RLO podem causar apoptose e o aumento da produção desses radicais é considerável durante a injúria de isquemia e reperfusão (BUTTKE & SANDSTROM, 1994; RATAN & BARABAN, 1995). Existe uma proposta de interação entre a matriz extracelular e as células, representando um papel crítico na causa da apoptose. Neste caso, a morte celular ocorre quando há rompimento dos contatos (complexos juncionais) e este fenômeno é denominado anoiquia (FRISCH & FRANCIS, 1994). Células epiteliais atingidas perdem seu contato com o estroma das vilosidades; isso poderia indicar que a apoptose induzida pela isquemia e isquemia/reperfusão poderia representar anoiquia (IKEDA et al., 1998).

2.6 O estresse cirúrgico e o intestino

O intestino é susceptível ao estresse durante as cirurgias; o trauma cirúrgico induz ao estresse oxidativo e danos por meio do aumento da produção de RLO (KANG et al., 1998). O estresse cirúrgico aumenta a permeabilidade

intestinal e induz a translocação de bactérias na circulação sistêmica (SEDMAN et al., 1994). Neste caso ocorrem mudanças metabólicas profundas, disfunção de órgãos e imunossupressão durante cirurgias gastrointestinais, o que representa parte da resposta de estresse cirúrgico ao trauma (KEHLET & MOESGAARD, 1996).

Mesmo quando são realizadas cirurgias em locais remotos o intestino é altamente susceptível ao estresse oxidativo. A manipulação moderada do intestino durante uma laparotomia causa estresse oxidativo nos enterócitos, acompanhado de alterações funcionais do órgão (ANUP et al., 1999). Além disso, durante o estresse cirúrgico existe um aumento da atividade da xantina oxidase e aumento dos RLO, o que ativa proteases na mitocôndria dos enterócitos. O aumento na atividade das proteases mitocondriais pode ser responsável pela indução da transição da permeabilidade mitocondrial e disfunção mitocondrial observados durante o estresse cirúrgico (RAMACHANDRAN & BALASUBRAMANIAN, 2000).

2.7 MAP Quinases: proteínas quinases ativadas por mitógeno

O controle da divisão e diferenciação celulares é mediado por interações de moléculas de sinalização na superfície celular, o que por sua vez, leva a mudanças em longo prazo na expressão de genes. Na maioria das células, as MAP quinases (MAPK), as quais fazem parte de um grupo de enzimas citoplasmáticas da família das proteínas quinases serina-treonina, transmitem os sinais mitogênicos e de diferenciação celular (ALIAGA et al., 1999). Essas enzimas são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares como lipopolissacarídeos (LPS), hipóxia e liberação de citocinas inflamatórias (PEARSON et al., 2001) e regulam atividades celulares como expressão de genes, diferenciação celular, embriogênese, mitose, movimento, metabolismo e morte programada (JOHNSON & LAPADAT, 2002). Existem grandes evidências de que as MAP quinases são ativadas durante a isquemia e/ou reperfusão e podem contribuir com mudanças estruturais e funcionais do órgão afetado (ABE et al., 2000).

Existem quatro subgrupos distintos da família das MAPK descritos: quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), c-jun N-terminal ou quinases ativadas por estresse (JNK/SAPK), MAP quinase 1 ERK/big (BMK1) e quinases do grupo p38 (ONO & HAN, 2000). As três principais MAPKs que participam do mecanismo de sinalização incluem a via ERK, p38 e JNK, identificadas nas células dos mamíferos (YUE et al., 2000).

A ativação da MAPK-p38 e JNK está geralmente associada à apoptose, enquanto que ERK 1/2 ativadas possuem função protetora, ou seja, de inibir a atividade da apoptose (CROSS et al., 2000; YUE et al., 2000). ERK 1 e 2 são expressas amplamente e estão envolvidas na regulação de mitose, meiose e funções pós-mitóticas em células diferenciadas (JOHNSON & LAPADAT, 2002). Quinases do grupo p38 compartilham mecanismos muito semelhantes aos das outras MAPK e estão envolvidas na inflamação, crescimento, diferenciação, ciclo e morte celulares (ONO & HAN, 2000).

As MAPK constituem um módulo de três quinases, formando um sistema regulatório que estabelece uma via sequencial de ativação de proteínas quinase: a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), a MAP quinase quinase (MAPKK) e a MAP quinase. Os sinais em geral são transmitidos por meio de fosforilação sequencial e ativação desses componentes (WHITMARSH & DAVIS, 1999).

O primeiro componente do módulo MAPKKK pode ser ativado tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras ou Rho. As MAPKKK são quinases serina/treonina que, quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase no módulo, a MAP quinase quinase (MAPKK). As MAP quinases (MAPK) constituem a quinase final no módulo de ativação e fosforilam seus substratos em resíduos de serina e treonina. A grande maioria dos substratos das MAPK é formada por fatores de transcrição. As MAPK podem ser categorizadas em cinco subfamílias: MAPK-ERK 1/2, MAPK-p38, MAPK-JNK, MAPK-ERK 5 e as MAPK ERK 3/4. As MAPK nomeiam a via de transdução de sinal onde são empregadas, isto é, via da ERK 1/2, via da MAPK-p38, e assim sucessivamente. A atividade das MAPK é controlada pela dupla fosforilação de uma sequência de aminoácidos conhecida por alça de ativação. As MAPKK são quinases que reconhecem e fosforilam um motivo Thr-X-Tyr

(treonina-aminoácido X-tirosina) na alça de ativação da MAPK, o que define as MAPKK como quinases de dupla especificidade. A sequência Thr-X-Tyr na alça de ativação, onde X representa diferentes aminoácidos, entre os diversos tipos de MAPK, é o sítio para a dupla fosforilação e corresponde a Thr-183 e Tyr-185. A dupla fosforilação desses sítios resulta em um aumento da atividade específica da MAPK em mais de 1000 vezes (WIDMANN et al., 1999).

As MAPK também são capazes de ativar outras quinases a jusante, o que acrescenta mais um nível de quinases à cascata de ativação. Por exemplo, ERK 1/2 é capaz de ativar as isoformas de RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*), enquanto p38 α ativa MAPKAP-K2 e K3. MSK1 e MSK2 são duas quinases a jusante da cascata que, de forma incomum, são ativadas tanto por ERK 1/2, quanto p38 (DEAK et al., 1998).

A via da ERK 1/2 tem como principal MAPKKK a isoforma Raf-1 (ou c-Raf), enquanto que a MAPKK desta via é constituída das isoformas MEK 1/2. Raf-1 faz parte da família das isoformas Raf, que são proteínas capazes de fosforilar MEK em uma cascata única (KYRIAKIS et al., 1992). Esta via constitui uma cascata de eventos de ativação enzimática por meio de fosforilações que resultam em ativação da ERK 1/2 e seus substratos. Quando o receptor tirosina quinase (RTK) é estimulado, os domínios tirosina quinase intrínsecos são ativados, resultando na fosforilação em tirosina de substratos específicos, incluindo estes mesmos. A fosforilação em tirosina do RTK permite que a este se liguem proteínas de adaptação, que apresentam em suas sequências de aminoácidos motivos específicos envolvidos em interações proteína-proteína (WIDMANN et al., 1999).

A proteína de adaptação Shc consiste em um domínio de ligação de fosfotirosina (PTB), domínio de homologia 2 Src (SH2), que assim como PTB se liga a resíduos de fosfotirosina e domínio de homologia 3 Src (SH3). Após a ativação do RTK, Shc liga-se a uma fosfotirosina específica do receptor por meio do domínio PTB. A associação de Shc com o receptor permite a fosforilação em tirosina de Shc pelo próprio RTK, ou por outra quinase intracelular como Src. Essa fosforilação permite a ligação de outra proteína de adaptação Grb2, que é formada por um domínio SH2 e dois domínios SH3. A associação entre Shc e Grb2 é mediada pelo domínio SH2 de Grb2. Essas associações amplificam a

quantidade de Grb2 integradas ao receptor. Como o fator de troca de nucleotídeo guanina Sos (*son of sevenless*) liga-se constitutivamente ao domínio SH3 de Grb2, a ligação de Grb2 com o RTK também recruta Sos. A ligação de Sos ao RTK também leva a uma troca de Ras-GDP por GTP na membrana plasmática. Ras-GTP interage com MAPKKK-9 (também conhecida como Raf-1), ligando-se ao domínio regulador N-terminal da quinase. Ras-GTP dirige Raf-1 para a membrana plasmática onde a quinase é ativada por fosforilação em tirosina em Tyr-340 e Tyr-341 por quinases ligadas à membrana, como por exemplo, Src. Raf-1 ativado pode fosforilar as MAPKK da via ERK 1/2 (WIDMANN et al., 1999).

MEK 1/2 são altamente homólogas em sequência primária de aminoácidos, funcionando como uma serina/treonina quinase de dupla especificidade. ERK 1/2 possuem uma sequência Thr-Glu-Tyr na alça de ativação do domínio catalítico da quinase, que é fosforilada por MEK 1/2 ativadas. As MEK 1/2 possuem um sinal de exportação nuclear que as mantém fora do núcleo. Foi proposto que MEK-1 em estado inativo sequestra ERK 1/2 no citoplasma. ERK 1/2 ativada rapidamente transloca-se para o núcleo, onde é funcionalmente sequestrada e regula a atividade de proteínas nucleares, incluindo fatores de transcrição. A inativação de ERK requer a sua desfosforilação por fosfatases específicas; a forma desfosforilada retorna ao citoplasma e associa-se novamente a MEK 1/2. As fosfatases que desativam ERK 1/2 incluem MKP-1 (CL-100) e MKP-3 (Pyst 1), que podem desfosforilar o motivo Thr (P)-Glu-Tyr (P) de ERK 1/2 ativadas. Enquanto MKP-1 é localizada no núcleo, MKP-3 é primariamente citoplasmática (WIDMANN et al., 1999).

O mecanismo da apoptose envolve componentes múltiplos, além de um elemento central da família das proteínas Bcl-2 (GREEN & REED, 1998; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Essas proteínas têm múltiplos locais de fosforilação, portanto acredita-se que várias proteínas kinases estejam envolvidas na regulação das Bcl-2. De fato, a fosforilação de Bcl-2 e Bcl-X_L pelas ERKs já foi observada, embora os efeitos de sua atividade antiapoptótica ainda não tenham sido totalmente elucidados (ITO et al., 1997; MORIYAMA et al., 1997). Isso sugere que as ERKs atuam à montante em relação à família de proteínas Bcl-2 (MORIYAMA et al., 1997). Raf-1 é um dos fatores mais importantes na prevenção da apoptose. Estudos mostraram que Bcl-2 pode direcionar Raf-1 para a

mitocôndria e que Raf-1 ativo ligado às sequências alvo das proteínas da membrana externa da mitocôndria protege a célula contra apoptose (WANG et al., 1996).

A MAPK p38 também é conhecida como CSBP, mHOG1, RK e SAPK2 (LEE et al., 1994). O módulo desta MAPK consiste em inúmeras MAPKKs, as MAPKKs MEK3 e MEK6, além de suas quatro isoformas α , β , γ e δ (KYRIAKIS & AVRUCH, 2001). Essas isoformas são fortemente ativadas por estresse ambiental e citocinas inflamatórias, mas não são ativadas por estímulos mitogênicos (LEE et al., 1994). MEK3 e MEK6 são ativadas por uma plethora de MAPKKs, as quais se tornam ativadas em resposta a vários tipos de estresse físicos e químicos, como o estresse oxidativo, radiação ultravioleta, hipóxia, isquemia e várias citocinas (CHEN et al., 2001). MEK3 e MEK6 mostram alto grau de especificidade por p38, já que as mesmas não ativam ERK 1/2 ou JNK (MEIER et al., 1996). Enquanto MEK6 ativa todas as isoformas de p38, MEK3 é mais seletiva e é capaz de fosforilar preferencialmente as isoformas α e β (ENSLEN et al., 2000). A ativação das isoformas de p38 resulta da fosforilação catalizada por MEK3/6 de um motivo Thr-Gly-Tyr (TGY-treonina-glicina-tirosina) em sua alça de ativação (WANG et al., 1997).

A MAPK p38 está presente no núcleo e citoplasma das células quiescentes (RAINGEAUD et al., 1995) e pode ser ativada nos dois locais. Existem evidências de que, após a ativação, p38 se transloca do citoplasma para o núcleo (RAINGEAUD et al., 1995), mas também há dados que indicam que, quando ativada, p38 também é encontrada no citoplasma de células estimuladas (BEN-LEVY et al., 1998).

Há vários indícios de que a atividade de p38 é crítica para as respostas imunes e inflamatórias normais. A enzima é ativada em macrófagos, neutrófilos e linfócitos por inúmeros mediadores extracelulares da inflamação (ONO & HAN, 2000). A forma ativada de p38 fosforila vários alvos celulares, incluindo a fosfolipase A2 citosólica, a proteína microtubular Tau e os fatores de transcrição ATF1 e 2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF- κ B, Ets-1 e p53 (KYRIAKIS & AVRUCH, 2001). A MAPK p38 também ativa várias MKs (proteína quinase ativada por MAPK), como MSK1 e 2, MNK1 e 2, e MK2 e 3 (ROUX & BLENIS, 2004). A via de transdução de sinal das MAPK está esquematizada na Figura 3.

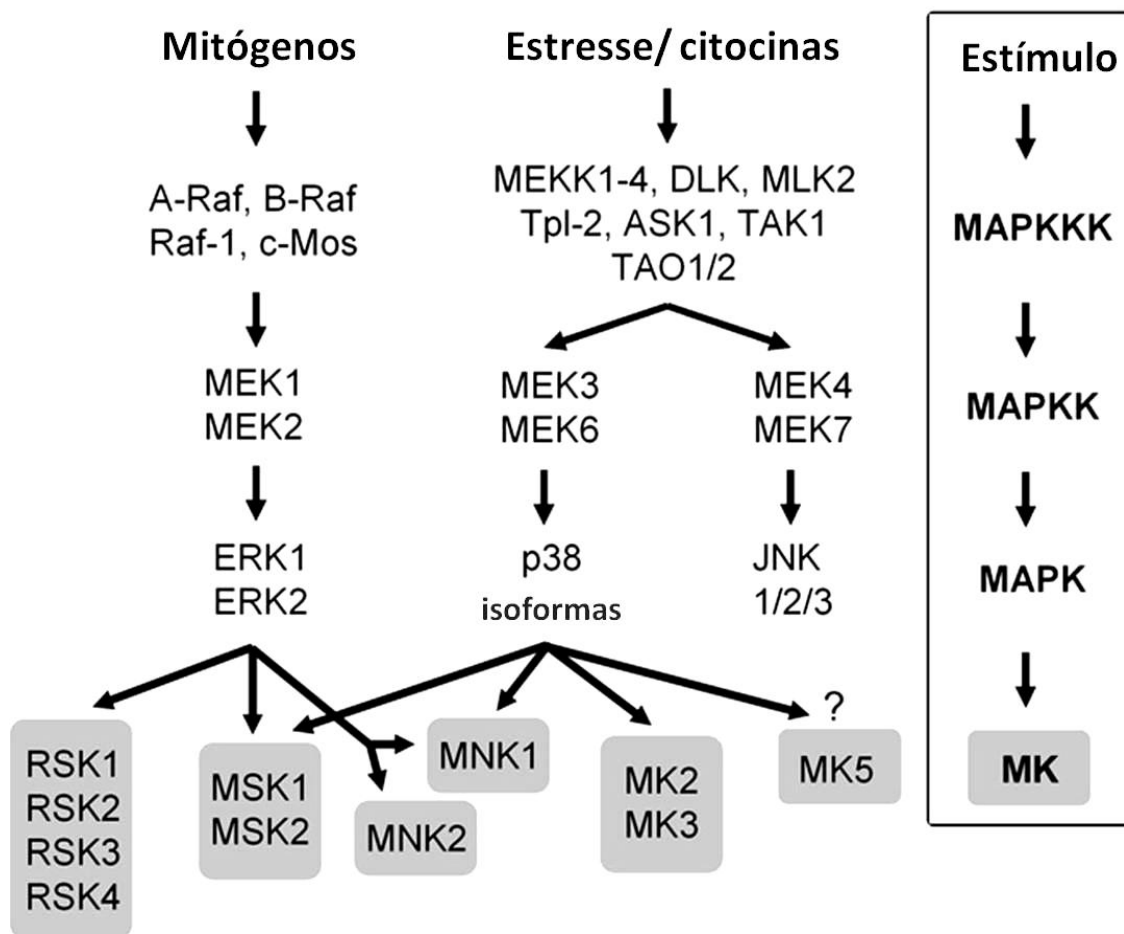


Figura 3- Cascata de ativação levando à ativação das MKs. Mitógenos e estresse celular promovem ativação das cascatas de ERK 1/2 e p38, que por sua vez, fosforilam e ativam subgrupos de MK.
Fonte: ROUX & BLENIS, 2004.

2.7.1 p38 na isquemia e reperfusão

O estresse provocado pela isquemia e reperfusão resulta em acentuada ativação de p38 no núcleo das células (MURAYAMA et al., 2006). A via de transdução regulada por p38 contribui de forma substancial para a apoptose. Os mecanismos pelos quais a p38 induz à apoptose são muito específicos em relação às células e ao estímulo (ABE et al., 2000). Um número crescente de trabalhos sugere que a interferência no funcionamento da MAPK p38 é capaz de reduzir a extensão da injúria tecidual em vários modelos

experimentais no coração, intestino e fígado (SANTEN et al., 2009). Um estudo demonstrou que a p38 exerce um papel crucial no mecanismo de transdução de sinal, mediando a apoptose intestinal pós-isquêmica. A inibição da sua ativação pode atenuar a injúria de reperfusão, reduzindo a apoptose do epitélio intestinal e melhorando a função da barreira epitelial (ZHENG et al., 2005).

Entretanto, existem evidências de um papel protetor para p38 durante a isquemia. Um exemplo disso é o fato de p38 fosforilar MAPKAPK2, que por sua vez fosforila HSP27. A ativação desta via é citoprotetora e uma expressão excessiva de HSP27 confere proteção à isquemia em miócitos (BONNI et al., 1999). Esses achados podem ser explicados pela ativação de diferentes isoformas de p38. A isoforma p38 α parece ser pró-apoptótica, enquanto p38 β parece ser antiapoptótica em miócitos ventriculares de ratos neonatos (BRUNING et al., 2000). Portanto, alguns dados sugerem papéis múltiplos de p38 diante de isquemia e reperfusão (ABE et al., 2000).

2.7.2 ERK na isquemia e reperfusão

As ERK são ativadas em resposta aos estímulos dos fatores de crescimento, o que é essencial para a proliferação e diferenciação celulares (MANSOUR et al., 1994). Além disso, outros trabalhos comprovaram que a ativação dos mecanismos de sinalização das ERK está relacionada à sobrevivência das células (XIA et al., 1995).

ERK 1/2 estão distribuídas nas células quiescentes, mas quando estimuladas, grande quantidade de ERK 1/2 se acumula nos núcleos (CHEN et al., 1992). Esta enzima é ativada em resposta ao estresse isquêmico em inúmeros tipos celulares (MAMMEN, 2009). O estresse isquêmico pode levar a uma inibição da fosfatase, o que provoca um aumento nos níveis de ativação (fosforilação) de ERK 1/2 (HO et al., 2007). Além disso, a isquemia leva a um influxo de cálcio em determinadas células, o que também provoca ativação de ERK (GRAY et al., 2005).

Um experimento realizado com culturas de cardiomiócitos submetidos à isquemia e reperfusão, onde a ativação de ERK foi inibida com PD98059,

resultou em um aumento do número de células apoptóticas. Esse resultado sugere que a ativação de ERK tem um papel importante na prevenção da apoptose induzida pela isquemia e reperfusão (YUE et al., 2000). O papel de ERK 1/2 na proteção de células cardíacas em relação às injúrias decorrentes dos insultos isquêmicos já está bem estabelecido (DE JONGE et al., 2006). Entretanto, em alguns modelos também foi identificado um papel de ERK 1/2 na indução da apoptose em resposta ao estresse isquêmico (ZHUANG & SCHNELLMANN, 2006).

2.8 Importância da isquemia e reperfusão intestinal na espécie equina

A síndrome cólica é uma preocupação constante no âmbito da criação de equinos do mundo inteiro. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que aproximadamente 4% dos cavalos apresentam um episódio de cólica anualmente com índice de fatalidade de 11% (TRAUB-DARGATZ et al., 2001).

Entre os inúmeros mecanismos fisiopatológicos da cólica equina, a obstrução do intestino delgado por estrangulamento constitui uma das principais causas de óbito. Trata-se de um processo que cursa simultaneamente com a oclusão do lúmen e da vasculatura intestinais, resultando em lesão isquêmica da mucosa (WHITE et al., 1980; GERARD et al., 1999). A lesão isquêmica também pode ocorrer como resultado de outros processos patológicos, como os casos de obstrução simples, onde a progressão da distensão no aspecto proximal à obstrução leva a um aumento da pressão intraluminal e consequente, oclusão da circulação na parede intestinal (ALLEN & TYLER, 1990). Além disso, podem ocorrer casos de infarto não estrangulante, os quais normalmente estão relacionados à migração de parasitas pelos vasos (WHITE, 1981).

2.9 Solução de Carolina Rinse e a injúria de reperfusão

Os tratamentos atuais, com o intuito de proteger os tecidos contra as injúrias de reperfusão, incluem a aplicação de várias moléculas extracelulares

sinalizadoras e a manipulação de uma variedade de mecanismos de sinalização. Contudo, pouco se sabe sobre os eventos iniciais que desencadeiam a alternância entre a injúria reversível da mucosa e os danos irreversíveis, os quais levam à necrose das células das vilosidades do intestino (GUAN et al., 2009).

Muitas opções de tratamento com mediadores farmacológicos visam alterar os efeitos de uma parte dos mecanismos da reperfusão e mostram resultados variáveis. Estudos utilizando tratamentos multimodais e outros que visam reparar a mucosa danificada, ou tratar os efeitos vasculares, parecem trazer resultados mais satisfatórios. O objetivo da terapia é cessar os eventos bioquímicos, o mais cedo possível, na cascata da reperfusão (ROWE & WHITE, 2002).

Em uma situação clínica isso nem sempre é possível, já que a reperfusão pode ser iniciada antes que o tratamento possa ser estabelecido. Mesmo assim, pelo fato da inflamação ou subsequente resposta reparadora excessiva iniciada pela reperfusão parecer continuar por dias ou semanas, o tratamento durante a fase inicial do processo pode prevenir algumas das sequelas patológicas. Os tipos de tratamento incluem aqueles que procuram preservar a integridade da célula que sofreu isquemia, os que cessam a formação de radicais livres de oxigênio e os metabólitos reativos subsequentes, os que previnem a migração de neutrófilos, ou ainda os que tratam os danos da vasculatura e dos tecidos causados pela inflamação (ROWE & WHITE, 2002).

A terapia multimodal consiste no uso de soluções de enxágue ou de lavagem. Estas soluções combinam substâncias que visam melhorar a circulação, preservar o endotélio e inativar radicais livres e têm sido amplamente aplicadas na perfusão de órgãos de doadores, antes de transplantes experimentais (LEMASTERS & THURMAN, 1997). Alguns compostos que bloqueiam a formação de radicais superóxido ou outros eventos vasculares agudos são estudados, mas poucos parecem ser realmente eficazes (GRISHAM et al., 1986).

Com o objetivo de minimizar a injúria de reperfusão após o transplante de fígado em ratos, a solução de Carolina Rinse, um composto que contém eletrólitos similares aos do plasma, além de alopurinol, glutatona, deferoxamina, nicardipina, glicina, adenosina, frutose e glucose, em pH 6.5, foi desenvolvida pela Universidade da Carolina do Norte, EUA (CURRIN et al., 1990). Esta solução

foi utilizada experimentalmente na artéria jejunal de um segmento intestinal de equinos, dez minutos antes da reperfusão e demonstrou ser benéfica na atenuação das mudanças de permeabilidade capilar e formação de edema. A CRS também se mostrou efetiva em casos de uso tópico e intraluminal no jejuno isquêmico de equinos (DABAREINER et al., 2005). A formulação da CRS está descrita no Quadro 1.

O alopurinol, a glutathione e a deferoxamina são considerados antioxidantes (YIN et al., 2002). O alopurinol, um inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese de ácido úrico, inibe a xantina oxidase. Seu uso como pré-tratamento parece prevenir o aumento da permeabilidade microvascular, a aderência e o infiltrado de neutrófilos associados à injúria de I/R em gatos (GRISHAM et al., 1986). A deferoxamina, um agente quelador de ferro, inibe as reações de formação de radicais hidroxil catalisadas pelo ferro, a partir do peróxido de hidrogênio e, teoricamente, seu uso parece ser uma boa opção (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988). A glutathione é um antioxidante endógeno importante, presente em todas as células, que funciona como um co-substrato da glutathione peroxidase para reduzir a formação de peróxidos (BILZER et al., 1999). A glutamina, que é precursora da glutathione, é rapidamente absorvida e metabolizada pelos enterócitos (WINDMUELLER & SPAETH, 1975) e é considerada o aminoácido mais abundante do sangue (RAMADAN & GREENBERG, 1963). A glutamina previne a apoptose intestinal, agindo como fonte essencial de energia para manter as concentrações celulares de ATP (PAPACONSTANTINO et al., 1998).

A glicina e o pH ácido da CRS promovem efeito protetor generalizado, enquanto a adenosina induz ao relaxamento da musculatura lisa, promovendo vasodilatação e, como isso, melhora a microcirculação (DABAREINER et al., 2003). Contudo, um estudo demonstrou que os efeitos benéficos da adenosina em transplantes de fígado em ratos só foram observados quando as concentrações utilizadas foram baixas, possivelmente devido à participação da adenosina, em altas concentrações nas células, na produção de radicais livres (GAO et al., 1991).

A frutose, glicose e insulina suportam a glicólise auxiliando a reposição de ATP perdido, que ocorre devido à disfunção mitocondrial pós-isquêmica. A

nicardipina é um bloqueador de canais de cálcio que parece reduzir a sobrecarga de cálcio induzida pela reperfusão (YIN et al., 2002). Entretanto, um estudo mostrou que a nicardipina pode evitar a ativação de ERK 1/2 nas artérias basilares de coelhos (ZUBKOV et al., 2002), embora outros estudos não tenham elucidado este mecanismo de modulação da via ERK.

QUADRO 1- Formulação da Solução de Carolina Rinse

Peso molecular	Componente	Quantidade
-	Água destilada deionizada	1000 ml
115 mM	NaCl	6.7g/L
5 mM	KCl	0.37 g
1.30 mM	CaCl ₂ *2H ₂ O	0.19 g
1 mM	KH ₂ PO ₄	0.14 g
1.2 mM	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.30 g
1 mM	Alopurinol	0.14 g
1 mM	Mesilato de deferoxamina	0.65 g
3 mM	Glutathione	0.92 g
2 µM	Nicardipina	1.02 mg
200 µM	Adenosina	0.065 g
10 mM	Frutose	1.8 g
10 mM	Glucose	1.8 g
100 U/L	Insulina	1 ml of 100 U/ml
20 mM	MOPS	4.2 g
5 mM	Glicina	0.37 g

Fonte: DUKTI & WHITE, 2008.

No fígado, a CRS previne a morte de células endoteliais provocada por reperfusão (CURRIN et al., 1990), protege os hepatócitos (CURRIN et al., 1991), suprime a ativação das células de Küpffer (GAO et al., 1991) e melhora a microcirculação e sobrevivência de enxertos após transplantes ortotópicos de fígado. O seu efeito é melhor quando usado aquecido (30 a 37 °C) (BACHMANN et al., 1992). Nos rins de ratos, após isquemia provocada pela armazenagem fria, a CRS mostrou-se eficaz na proteção contra injúria de reperfusão (YIN et al., 2002).

Em equinos, o uso da CRS intra-arterial e tópico foi eficaz, reduzindo a resposta inflamatória causada pela isquemia e reperfusão (DABAREINER et al., 2003). A combinação da CRS tópica e intraluminal parece ser um tratamento clinicamente aplicável para prevenir as mudanças inflamatórias imediatas que ocorrem devido à reperfusão após isquemia de baixo fluxo (YOUNG et al., 2002).

Esta tese teve como objetivos investigar os efeitos do uso tópico e intraluminal da solução de Carolina Rinse na injúria de isquemia e reperfusão e no perfil de ativação das MAP quinases ERK 1/2 e p38 no jejuno de coelhos.

3 Referências

1. ABE, J.; BAINES, C. P.; BERK, B. C. Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury: the good and the bad. **Circulation Research**, Baltimore, v. 86, n. 6, p. 607-609, 2000.
2. ABREU, J. M. G.; ALVES, G. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; RIBEIRO FILHO, J. D.; FALEIROS, R. R. Efeitos da isquemia e da reperfusão na ocorrência de apoptose no jejuno em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, p. 35-40, 2007.
3. ALIAGA, J. C.; DESCHÊNES, C.; BEAULIEU, J.; CALVO, E. L.; RIVARD, N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. n. p. G631- G641, 1999.
4. ALLEN, D., JR.; TYLER, D. E. Pathophysiology of acute abdominal disease. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. p.65-87.
5. ANDREWS, F. J.; MALCONTENTI-WILSON, C.; O'BRIEN, P. E. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 39, n. 2, p. 366-373, 1994.
6. ANUP, R.; APARNA, V.; PULIMOOD, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Surgical stress and the small intestine: role of oxygen free radicals. **Surgery**, Philadelphia, v. 125, n. 5, p. 560-569, 1999.
7. BACHMANN, S.; CALDWELL-KENKEL, J. C.; OLEKSY, I.; STEFFEN, R.; THURMAN, R. G.; LEMASTERS, J. J. Warm Carolina rinse solution prevents graft failure from storage injury after orthotopic rat liver transplantation with arterialization. **Transplant International**, New York, v. 5, n. 2, p. 108-114, 1992.

8. BARIE, P. S. Schemes against ischemia; solutions for reperfusion (injury)? **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 27, n. 4, p. 684-685, 1999.

9. BEN-LEVY, R.; HOOPER, S.; WILSON, R.; PATERSON, H. F.; MARSHALL, C. J. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. **Current Biology**, London, v. 8, n. 19, p. 1049-1057, 1998.

10. BILZER, M.; PAUMGARTNER, G.; GERBES, A. L. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 117, n. 1, p. 200-210, 1999.

11. BLIKSLAGER, A. T. Treatment of gastrointestinal ischemic injury. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 715-727, 2003.

12. BLIKSLAGER, A. T.; MOESER, A. J.; GOOKIN, J. L.; JONES, S. L.; ODLE, J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 87, n. 2, p. 545-564, 2007.

13. BONNI, A.; BRUNET, A.; WEST, A. E.; DATTA, S. R.; TAKASU, M. A.; GREENBERG, M. E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. **Science**, Washington, v. 286, n. 5443, p. 1358-1362, 1999.

14. BORGSTROM, A.; HAGLUND, U. H. RProteases:hole in mucosal injury. In: MARSTON A, B. G., FIDDAN-GREEN RG, HAGLUND UH **Splanchnic Ischemia and Multiple Organ Failure**. St. Louis: Mosby, 1989. p.159-163.

15. BRETZ, B.; BLAZE, C.; PARRY, N.; KUDEJ, R. K. Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 216-223, 2010.

16. BREWER, N. R. Biology of the rabbit. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 45, n. 1, p. 8-24, 2006.
17. BRUNING, J. C.; GILLETTE, J. A.; ZHAO, Y.; BJORBAECK, C.; KOTZKA, J.; KNEBEL, B.; AVCI, H.; HANSTEIN, B.; LINGOHR, P.; MOLLER, D. E.; KRONE, W.; KAHN, C. R.; MULLER-WIELAND, D. Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 6, p. 2462-2467, 2000.
18. BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 7-10, 1994.
19. CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 6, p. 417, 2002.
20. CHAN, K. L.; ZHANG, X. H.; FUNG, P. C.; GUO, W. H.; TAM, P. K. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. **British Journal of Surgery**, Guildford, v. 86, n. 11, p. 1427-1432, 1999.
21. CHANG, T. H.; LIU, X. Y.; ZHANG, X. H.; WANG, H. L. Effects of dl-praeruptorin A on interleukin-6 level and Fas, bax, bcl-2 protein expression in ischemia-reperfusion myocardium. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 23, n. 9, p. 769-774, 2002.
22. CHEN, R. H.; SARNECKI, C.; BLENIS, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 12, n. 3, p. 915-927, 1992.
23. CHEN, Z.; GIBSON, T. B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M. H. MAP kinases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 101, n. 8, p. 2449-2476, 2001.

24. CHIU, C. J.; MCARDLE, A. H.; BROWN, R.; SCOTT, H. J.; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 101, n. 4, p. 478-483, 1970.

25. COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 111, n. 11, p. 918-931, 1989.

26. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Cellular injury and cellular death. In: **Robbins pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 1994. p.1-34.

27. CROSS, T. G.; SCHEEL-TOELLNER, D.; HENRIQUEZ, N. V.; DEACON, E.; SALMON, M.; LORD, J. M. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 34-41, 2000.

28. CURRIN, R. T.; THURMAN, R. G.; LEMASTERS, J. J. Carolina rinse solution protects adenosine triphosphate-depleted hepatocytes against lethal cell injury. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 23, n. 1, p. 645-647, 1991.

29. CURRIN, R. T.; TOOLE, J. G.; THURMAN, R. G.; LEMASTERS, J. J. Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver. **Transplantation**, New York, v. 50, n. 6, p. 1076-1078, 1990.

30. CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F. A.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. **Shock**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 169-176, 2002.

31. DABAREINER, R. M.; SNYDER, J. R.; WHITE, N. A.; PASCOE, J. R.; HARMON, F. A.; GARDNER, I.; WOLINER, M. J.; PINNEY, D.; SULLINS, K. E.

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.

32. DABAREINER, R. M.; SULLINS, K. E.; WHITE, N. A.; SNYDER, J. R. Serosal injury in the equine jejunum and ascending colon after ischemia-reperfusion or intraluminal distention and decompression. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 114-125, 2001a.

33. DABAREINER, R. M.; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. Evaluation of Carolina Rinse solution as a treatment for ischaemia reperfusion of the equine jejunum. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 35, n. 7, p. 642-646, 2003.

34. DABAREINER, R. M.; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. L. Effects of intraluminal distention and decompression on microvascular permeability and hemodynamics of the equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 225-236, 2001b.

35. DABAREINER, R. M.; WHITE, N. A.; SNYDER, J. R.; FELDMAN, B. F.; DONALDSON, L. L. Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and the 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 525-536, 2005.

36. DART, A. J.; SNYDER, J. R.; JULIAN, D.; HINDS, D. M. Microvascular circulation of the small intestine in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 6, p. 995-1000, 1992.

37. DE JONGE, N.; GOUMANS, M. J.; LIPS, D.; HASSINK, R.; VLUG, E. J.; VAN DER MEEL, R.; EMMERSON, C. D.; NIJMAN, J.; DE WINDT, L.; DOEVENDANS, P. A. Controlling cardiomyocyte survival. **Novartis Foundation Symposium**, v. 274, n. p. 41-51, 2006.

38. DEAK, M.; CLIFTON, A. D.; LUCOCQ, L. M.; ALESSI, D. R. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. **The EMBO journal**, Oxford, v. 17, n. 15, p. 4426-4441, 1998.

39. DERIKX, J. P.; MATTHIJSEN, R. A.; DE BRUINE, A. P.; VAN BIJNEN, A. A.; HEINEMAN, E.; VAN DAM, R. M.; DEJONG, C. H.; BUURMAN, W. A. Rapid reversal of human intestinal ischemia-reperfusion induced damage by shedding of injured enterocytes and reepithelialisation. **PLoS One**, Berkeley, v. 3, n. 10, p. e3428, 2008.

40. DORAN, R.; ALLEN, D.; ORSINI, J. A. Small intestine. In: AUER, J. A. **Equine Surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p.360-378.

41. DUKTI, S.; WHITE, N. Surgical complications of colic surgery. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 24, n. 3, p. 515-534, 2008.

42. ENSLEN, H.; BRANCHO, D. M.; DAVIS, R. J. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1301-1311, 2000.

43. ERNSTER, L. Biochemistry of reoxygenation injury. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 16, n. 10, p. 947-953, 1988.

44. FLAHERTY, J. T.; WEISFELDT, M. L. Reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 5, n. 5-6, p. 409-419, 1988.

45. FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 124, n. 4, p. 619-626, 1994.

46. FU, X.; SHENG, Z.; WANG, Y.; YE, Y.; XU, M.; SUN, T.; ZHOU, B. Basic fibroblast growth factor reduces the gut and liver morphologic and functional injuries after ischemia and reperfusion. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, Berlin, v. 42, n. 6, p. 1080-1085, 1997.
47. GAO, W. S.; HIJIOKA, T.; LINDERT, K. A.; CALDWELL-KENKEL, J. C.; LEMASTERS, J. J.; THURMAN, R. G. Evidence that adenosine is a key component in Carolina rinse responsible for reducing graft failure after orthotopic liver transplantation in the rat. **Transplantation**, New York, v. 52, n. 6, p. 992-998, 1991.
48. GERARD, M. P.; BLIKSLAGER, A. T.; ROBERTS, M. C.; TATE, L. P., JR.; ARGENZIO, R. A. The characteristics of intestinal injury peripheral to strangulating obstruction lesions in the equine small intestine. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 31, n. 4, p. 331-335, 1999.
49. GOMES, O. M.; BRASILEIRO FILHO, G.; PORTO, L. A.; PRATA, P. H.; PAIXAO RDE, M. Ischemia-reperfusion histopathology alterations of the rabbit intestinal wall with and without exclusion of the collateral mesenteric circulation supply. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 318-321, 2010.
50. GRANGER, D. N.; HOLLWARTH, M. E.; PARKS, D. A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum**, Oxford, v. 548, n. p. 47-63, 1986a.
51. GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 57, n. p. 311-332, 1995.
52. GRANGER, D. N.; MCCORD, J. M.; PARKS, D. A.; HOLLWARTH, M. E. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 90, n. 1, p. 80-84, 1986b.

53. GRAY, J. J.; BICKLER, P. E.; FAHLMAN, C. S.; ZHAN, X.; SCHUYLER, J. A. Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular Ca^{2+} and mitogen-activated protein kinases. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 102, n. 3, p. 606-615, 2005.

54. GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Washington, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.

55. GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 251, n. 4, p. G567-574, 1986.

56. GUAN, Y.; WORRELL, R. T.; PRITTS, T. A.; MONTROSE, M. H. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. **The American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 1, p. G187-196, 2009.

57. HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology**, San Diego, v. 38, n. p. 3-20, 1997.

58. HERNANDEZ, L. A.; GRISHAM, M. B.; TWOHIG, B.; ARFORS, K. E.; HARLAN, J. M.; GRANGER, D. N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 253, n. 3, p. H699-703, 1987.

59. HINNEBUSCH, B. F.; MA, Q.; HENDERSON, J. W.; SIDDIQUE, A.; ARCHER, S. Y.; HODIN, R. A. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 403-409, 2002.

60. HO, Y.; LOGUE, E.; CALLAWAY, C. W.; DEFRANCO, D. B. Different mechanisms account for extracellular-signal regulated kinase activation in distinct

brain regions following global ischemia and reperfusion. **Neuroscience**, Oxford, v. 145, n. 1, p. 248-255, 2007.

61. IKEDA, H.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, M.; KOIKE, M.; TAMURA, J.; TONG, J.; NOMURA, M.; ITOH, G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. **Gut**, London, v. 42, n. 4, p. 530-537, 1998.

62. ITO, T.; DENG, X.; CARR, B.; MAY, W. S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, n. 18, p. 11671-11673, 1997.

63. JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, Washington, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.

64. JONES, T. C. Introduction: cell death and tissues. In: WILKINS, W. A. **Veterinary Pathology**. 6th.ed. Baltimore: 1997. p.11-13.

65. KANG, M. Y.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L.; MANABE, M. In vitro study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 4-12, 1998.

66. KATUSIC, Z. S.; SHEPHERD, J. T. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. **Hypertension**, Dallas, v. 18, n. 5 Suppl, p. III86-92, 1991.

67. KEHLET, H.; MOESGAARD, F. Prophylaxis against postoperative complications in gastroenterology. **Scandinavian Journal of Gastroenterology - Supplement**, Oslo, v. 216, n. p. 218-224, 1996.

68. KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, London, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.
69. KLEBANOFF, S. S. Products of oxygen metabolism. In: J. I. GALLIN, I. M. G. A. R. S. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, 1988. p.391-444.
70. KOOREMAN, K.; BABBS, C.; FESSLER, J. Effect of ischemia and reperfusion on oxidative processes in the large colon and jejunum of horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, n. 3, p. 340-346, 1998.
71. KUBES, P.; HUNTER, J.; GRANGER, D. N. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 103, n. 3, p. 807-812, 1992.
72. KUROSE, I.; WOLF, R.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. **Circulation Research**, Baltimore, v. 74, n. 3, p. 376-382, 1994.
73. KURTEL, H.; FUJIMOTO, K.; ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N.; TSO, P. Ischemia-reperfusion-induced mucosal dysfunction: role of neutrophils. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 261, n. 3 Pt 1, p. G490-496, 1991.
74. KYRIAKIS, J. M.; APP, H.; ZHANG, X. F.; BANERJEE, P.; BRAUTIGAN, D. L.; RAPP, U. R.; AVRUCH, J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. **Nature**, London, v. 358, n. 6385, p. 417-421, 1992.
75. KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 81, n. 2, p. 807-869, 2001.

76. LANTZ, G. C.; BADYLAK, S. F.; HILES, M. C.; ARKIN, T. E. Treatment of reperfusion injury in dogs with experimentally induced gastric dilatation-volvulus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 9, p. 1594-1598, 1992.
77. LEE, J. C.; LAYDON, J. T.; MCDONNELL, P. C.; GALLAGHER, T. F.; KUMAR, S.; GREEN, D.; MCNULTY, D.; BLUMENTHAL, M. J.; HEYS, J. R.; LANDVATTER, S. W.; ET AL. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, London, v. 372, n. 6508, p. 739-746, 1994.
78. LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A. F.; KUHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, n. 8, p. 1481-1486, 1997.
79. LEMASTERS, J. J.; THURMAN, R. G. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 37, n. p. 327-338, 1997.
80. LINDESTROM, L. M.; EKBLAD, E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 49, n. 7-8, p. 1212-1222, 2004.
81. LIU, K. X.; LI, Y. S.; HUANG, W. Q.; CHEN, S. Q.; WANG, Z. X.; LIU, J. X.; XIA, Z. Immediate postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 933-942, 2009.
82. MACHADO, M. R. F.; SOUZA, S. V.; OLIVEIRA, T. C.; CORTELLINI, L. M. F.; BARBOSA, R. R. Suprimento arterial dos intestinos do coelho da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*). **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 1, p. 101-105, 2008.

83. MAMMEN, J. M. V. **Ischemia/Reperfusion Injury in the Intestine: Important Roles for PKC, MAPK, and Adenosine**. 2009. 121 f. Thesis (PhD in Molecular and Cellular Physiology) - Department of Molecular and Cellular Physiology of the College Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati.
84. MANSOUR, S. J.; MATTEN, W. T.; HERMANN, A. S.; CANDIA, J. M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE WOUDE, G. F.; AHN, N. G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science**, Washington, v. 265, n. 5174, p. 966-970, 1994.
85. MASSBERG, S.; ENDERS, G.; LEIDERER, R.; EISENMENGER, S.; VESTWEBER, D.; KROMBACH, F.; MESSMER, K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. **Blood**, New York, v. 92, n. 2, p. 507-515, 1998.
86. MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.
87. MEI, F.; GUO, S.; HE, Y. T.; ZHU, J.; ZHOU, D. S.; NIU, J. Q.; WANG, H. Z.; TIAN, Y. P. Apoptosis of interstitial cells of Cajal, smooth muscle cells, and enteric neurons induced by intestinal ischemia and reperfusion injury in adult guinea pigs. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 454, n. 4, p. 401-409, 2009.
88. MEIER, R.; ROUSE, J.; CUENDA, A.; NEBREDA, A. R.; COHEN, P. Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 236, n. 3, p. 796-805, 1996.
89. MESCHTER, C. L.; TYLER, D. E.; WHITE, N. A.; MOORE, J. Histologic findings in the gastrointestinal tract of horses with colic. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 598-606, 1986.

90. MOORE, R. M. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 211, n. 11, p. 1362-1366, 1997.
91. MOORE, R. M.; BERTONE, A. L.; BAILEY, M. Q.; MUIR, W. W.; BEARD, W. L. Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 55, n. 10, p. 1454-1463, 1994.
92. MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 9, n. 3, p. 115-132, 1995.
93. MORIYAMA, M.; YAMOCHI, T.; SEMBA, K.; AKIYAMA, T.; MORI, S. BCL-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo. **Oncogene**, Basingstoke, v. 14, n. 20, p. 2465-2474, 1997.
94. MURAYAMA, T.; TANABE, M.; MATSUDA, S.; SHIMAZU, M.; KAMEI, S.; WAKABAYASHI, G.; KAWACHI, S.; MATSUMOTO, K.; YAMAZAKI, K.; KOYASU, S.; KITAJIMA, M. JNK (c-Jun NH2 terminal kinase) and p38 during ischemia reperfusion injury in the small intestine. **Transplantation**, New York, v. 81, n. 9, p. 1325-1330, 2006.
95. NEZU, Y.; SHIGIHARA, K.; HARADA, Y.; YOGO, T.; HARA, Y.; TAGAWA, M. Effects of small intestinal ischemia and reperfusion on expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNAs in the jejunum, liver, and lungs of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 69, n. 4, p. 512-518, 2008.

96. NODA, T.; IWAKIRI, R.; FUJIMOTO, K.; MATSUO, S.; AW, T. Y. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 274, n. 2, p. G270-276, 1998.
97. O'MAHONY, G. D.; GALLUCCI, M. R.; CORDOVA-FRAGA, T.; BERCH, B.; RICHARDS, W. O.; BRADSHAW, L. A. Biomagnetic investigation of injury currents in rabbit intestinal smooth muscle during mesenteric ischemia and reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 52, n. 1, p. 292-301, 2007.
98. ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cellular Signalling**, New York, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2000.
99. OTAMIRI, T.; FRANZEN, L.; LINDMARK, D.; TAGESSON, C. Increased phospholipase A2 and decreased lysophospholipase activity in the small intestinal mucosa after ischaemia and revascularisation. **Gut**, London, v. 28, n. 11, p. 1445-1453, 1987.
100. OTAMIRI, T.; TAGESSON, C. Role of phospholipase A2 and oxygenated free radicals in mucosal damage after small intestinal ischemia and reperfusion. **The American Journal of Surgery**, New York, v. 157, n. 6, p. 562-565; discussion 566, 1989.
101. PALOMBO, J. D.; BLACKBURN, G. L.; FORSE, R. A. Endothelial cell factors and response to injury. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, Chicago, v. 173, n. 6, p. 505-518, 1991.
102. PAPACONSTANTINOU, H. T.; HWANG, K. O.; RAJARAMAN, S.; HELLMICH, M. R.; TOWNSEND, C. M., JR.; KO, T. C. Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. **Surgery**, Philadelphia, v. 124, n. 2, p. 152-159; discussion 159-160, 1998.

103. PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 250, n. 6 Pt 1, p. G749-753, 1986.
104. PARKS, D. A.; GRANGER, D. N.; BULKLEY, G. B.; SHAH, A. K. Soybean trypsin inhibitor attenuates ischemic injury to the feline small intestine. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 89, n. 1, p. 6-12, 1985.
105. PARKS, D. A.; GROGAARD, B.; GRANGER, D. N. Comparison of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. **Surgery**, Philadelphia, v. 92, n. 5, p. 896-901, 1982.
106. PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B. E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.
107. PFEIFFER, C. J.; MACPHERSON, B. R. Anatomy of the gastrointestinal tract and peritoneal cavity. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. p.2-24.
108. PONTELL, L.; SHARMA, P.; RIVERA, L. R.; THACKER, M.; TAN, Y. H.; BROCK, J. A.; FURNESS, J. B. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 343, n. 2, p. 411-419, 2011.
109. RAINGEAUD, J.; GUPTA, S.; ROGERS, J. S.; DICKENS, M.; HAN, J.; ULEVITCH, R. J.; DAVIS, R. J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 13, p. 7420-7426, 1995.

110. RAMACHANDRAN, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Protease activation during surgical stress in the rat small intestine. **Journal of Surgical Research** Philadelphia, v. 92, n. 2, p. 283-290, 2000.
111. RAMADAN, M. E.; GREENBERG, D. M. An enzymic micromethod for determination of glutamine and asparagine in blood. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 6, n. p. 144-152, 1963.
112. RATAN, R. R.; BARABAN, J. M. Apoptotic death in an in vitro model of neuronal oxidative stress. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 309-310, 1995.
113. RIVERA, L. R.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BRON, R.; FURNESS, J. B. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 118, n. 2, p. 261-270, 2009.
114. ROMSON, J. L.; HOOK, B. G.; KUNKEL, S. L.; ABRAMS, G. D.; SCHORK, M. A.; LUCCHESI, B. R. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. **Circulation**, Baltimore, v. 67, n. 5, p. 1016-1023, 1983.
115. ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 68, n. 2, p. 320-344, 2004.
116. ROWE, E. L.; WHITE, N. A. Reperfusion injury in the equine intestine. **Clinical Techniques in Equine Practice**, Bethesda, v. 1, n. 3, p. 148-162, 2002.
117. ROWE, E. L.; WHITE, N. A.; BUECHNER-MAXWELL, V.; ROBERTSON, J. L.; WARD, D. L. Detection of apoptotic cells in intestines from horses with and without gastrointestinal tract disease. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 64, n. 8, p. 982-988, 2003.

118. SANTEN, S.; MIHAESCU, A.; LASCHKE, M. W.; MENDER, M. D.; WANG, Y.; JEPPSSON, B.; THORLACIUS, H. p38 MAPK regulates ischemia-reperfusion-induced recruitment of leukocytes in the colon. **Surgery**, Philadelphia, v. 145, n. 3, p. 303-312, 2009.

119. SCHOENBERG, M. H.; BEGER, H. G. Reperfusion injury after intestinal ischemia. **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 21, n. 9, p. 1376-1386, 1993.

120. SCHUMER, M.; COLOMBEL, M. C.; SAWCZUK, I. S.; GOBE, G.; CONNOR, J.; O'TOOLE, K. M.; OLSSON, C. A.; WISE, G. J.; BUTTYAN, R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 140, n. 4, p. 831-838, 1992.

121. SEDMAN, P. C.; MACFIE, J.; SAGAR, P.; MITCHELL, C. J.; MAY, J.; MANCEY-JONES, B.; JOHNSTONE, D. The prevalence of gut translocation in humans. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 107, n. 3, p. 643-649, 1994.

122. SEKHON, B.; SEKHON, C.; KHAN, M.; PATEL, S. J.; SINGH, I.; SINGH, A. K. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. **Brain Research**, Amsterdam, v. 971, n. 1, p. 1-8, 2003.

123. SHAH, K. A.; SHUREY, S.; GREEN, C. J. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. **Transplantation**, New York, v. 64, n. 10, p. 1393-1397, 1997.

124. SHEPHERD, A. P.; GRANGER, D. N. Metabolic regulation of intestinal circulation. In: A.P. SHEPHERD, D. N. G. **Physiology of the intestinal circulation**. New York: Raven Press, 2001. p.33-47.

125. SHIRES, G. M. Equine colic surgery. In: JENNINGS, P. B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 1984. p.664-680.

126. SNYDER, J. R. The pathophysiology of intestinal damage: effects of luminal distention and ischemia. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** Philadelphia, v. 5, n. 2, p. 247-270, 1989.
127. SUN, Z.; WANG, X.; WALLEN, R.; DENG, X.; DU, X.; HALLBERG, E.; ANDERSSON, R. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 33, n. 4, p. 415-422, 1998.
128. TAHA, M. O.; MIRANDA-FERREIRA, R.; SIMOES, R. S.; ABRAO, M. S.; OLIVEIRA-JUNIOR, I. S.; MONTEIRO, H. P.; SANTOS, J. M.; RODRIGUES, P. H.; RODRIGUES, J. V.; ALVES, A. E.; NASCIMENTO, E. C.; SILVA, T. L.; ZEVIANI, W. M.; CARICATI-NETO, A. Role of adenosine on intestinal ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Transplantation Proceedings**, Orlando, v. 42, n. 2, p. 454-456, 2010.
129. TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 9, n. 10, p. 866-873, 1995.
130. THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, Washington, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.
131. TOENS, C.; KRONES, C. J.; BLUM, U.; FERNANDEZ, V.; GROMMES, J.; HOELZL, F.; STUMPF, M.; KLINGE, U.; SCHUMPELICK, V. Validation of IC-VIEW fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. **International Journal of Colorectal Disease**, Berlin, v. 21, n. 4, p. 332-338, 2006.
132. TRAUB-DARGATZ, J. L.; KOPRAL, C. A.; SEITZINGER, A. H.; GARBER, L. P.; FORDE, K.; WHITE, N. A. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n. 1, p. 67-71, 2001.

133. UEDA, S.; YOSHIKAWA, T.; TAKAHASHI, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; OYAMADA, H.; TANIGAWA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology - Supplement**, Oslo, v. 162, n. p. 55-58, 1989.
134. VATISTAS, N. J.; SNYDER, J. R.; NIETO, J.; HILDEBRAND, S. V.; WOLINER, M. J.; HARMON, F. A.; BARRY, S. J.; DRAKE, C. Morphologic changes and xanthine oxidase activity in the equine jejunum during low flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 772-776, 1998.
135. WANG, H. G.; RAPP, U. R.; REED, J. C. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. **Cell**, v. 87, n. 4, p. 629-638, 1996.
136. WANG, Z.; HARKINS, P. C.; ULEVITCH, R. J.; HAN, J.; COBB, M. H.; GOLDSMITH, E. J. The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 6, p. 2327-2332, 1997.
137. WHITE, N. A. Intestinal infarction associated with mesenteric vascular thrombotic disease in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 178, n. 3, p. 259-262, 1981.
138. WHITE, N. A. Intestinal injury in the horse. In: B, S. **Large animal internal medicine**. St. Louis: Mosby, 2001. p.624-633.
139. WHITE, N. A. Pathology of the small and large intestine. In: CONGRESS ON EQUINE MEDICINE AND SURGERY, 8. 2003, Geneva. **Proceedings**, Ithaca, International veterinary information service, 16 dez. 2003. p. 6. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/geneva/2003/white2/ivis.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2011.

140. WHITE, N. A.; MOORE, J. N.; TRIM, C. M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 193-198, 1980.
141. WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. **Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches**, 1999. Disponível em: http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;1999/1/pe1. Acesso em: 10 jun 2004.
142. WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M. B.; JOHNSON, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.
143. WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 171, n. 2, p. 662-672, 1975.
144. XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R. J.; GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, Washington, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.
145. YIN, M.; CURRIN, R. T.; PENG, X. X.; MEKEEL, H. E.; SCHOONHOVEN, R.; LEMASTERS, J. J. Carolina rinse solution minimizes kidney injury and improves graft function and survival after prolonged cold ischemia. **Transplantation**, New York, v. 73, n. 9, p. 1410-1420, 2002.
146. YOUNES, M.; SCHOENBERG, M. H.; JUNG, H.; FREDHOLM, B. B.; HAGLUND, U.; SCHILDBERG, F. W. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. **Research in Experimental Medicine**, New York, v. 184, n. 4, p. 259-264, 1984.

147. YOUNG, B. L.; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. L.; DABAREINER, R. M. Treatment of ischaemic jejunum with topical and intraluminal Carolina Rinse. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 34, n. 5, p. 469-474, 2002.
148. YUE, T. L.; WANG, C.; GU, J. L.; MA, X. L.; KUMAR, S.; LEE, J. C.; FEUERSTEIN, G. Z.; THOMAS, H.; MALEEFF, B.; OHLSTEIN, E. H. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. **Circulation Research**, Baltimore, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.
149. ZHANG, M.; AUSTEN, W. G., JR.; CHIU, I.; ALICOT, E. M.; HUNG, R.; MA, M.; VERNA, N.; XU, M.; HECHTMAN, H. B.; MOORE, F. D., JR.; CARROLL, M. C. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 11, p. 3886-3891, 2004.
150. ZHENG, S. Y.; FU, X. B.; XU, J. G.; ZHAO, J. Y.; SUN, T. Z.; CHEN, W. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase may decrease intestinal epithelial cell apoptosis and improve intestinal epithelial barrier function after ischemia- reperfusion injury. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 5, p. 656-660, 2005.
151. ZHUANG, S.; SCHNELLMANN, R. G. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 319, n. 3, p. 991-997, 2006.
152. ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 259, n. 2 Pt 2, p. H390-394, 1990.
153. ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion injury. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 72, n. 1, p. 65-83, 1992.

154. ZIMMERMAN, B. J.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 258, n. 2 Pt 1, p. G185-190, 1990a.
155. ZIMMERMAN, B. J.; GUILLORY, D. J.; GRISHAM, M. B.; GAGINELLA, T. S.; GRANGER, D. N. Role of leukotriene B₄ in granulocyte infiltration into the postischemic feline intestine. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 99, n. 5, p. 1358-1363, 1990b.
156. ZUBKOV, A. Y.; ROLLINS, K. S.; ZHANG, J. H. KCl activates mitogen-activated protein kinase in rabbit biliary artery. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 293, n. 1, p. 660-664, 2002.

CAPÍTULO 2- Brief topical and intraluminal use of Carolina Rinse Solution does not attenuate experimental ischemia and reperfusion injury in jejunum of rabbits.

O uso breve da Solução de Carolina Rinse não atenua a injúria de isquemia e reperfusão experimental no jejuno de coelhos.

RESUMO

Os efeitos da Solução de Carolina Rinse (CRS) no modelo experimental de isquemia e reperfusão de jejuno em coelhos foram investigados neste estudo. Quinze coelhos da raça Nova Zelândia foram alocados em três grupos: Instrumentado (A), Isquemia e Reperfusão (B) e CRS (C). Os grupos B e C foram submetidos a uma hora de isquemia e duas horas de reperfusão. No grupo C, dez minutos antes da reperfusão, o lúmen do segmento isolado foi preenchido com CRS e o segmento foi imerso em CRS. No grupo C a hemorragia provocada pela colheita de amostras foi difícil de ser controlada com sutura. Nos animais dos grupos B e C foi observada necrose e perda progressiva da integridade das vilosidades ao longo do tempo. Não houve diferença na necrose de enterócitos do topo ou base das vilosidades. Foi observado edema na submucosa e camada muscular circular em todos os grupos e todos os tempos. Nos grupos B e C foi observada hemorragia em algumas camadas. O grupo C apresentou hemorragia mais intensa em algumas camadas durante a reperfusão, de acordo com os valores de média e mediana. Todos os grupos apresentaram infiltrado de PMN na base da mucosa, submucosa e camada muscular longitudinal. Foi observada marginação de PMN nos vasos da mucosa e submucosa em todos os grupos. Durante a reperfusão foi observada necrose dos enterócitos, camadas musculares, criptas de Lieberkühn e plexo mioentérico nos grupos B e C, sem diferença significativa entre esses grupos. O uso tópico e intraluminal de CRS não atenuou os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão no intestino delgado de coelhos.

Palavras-chave: Histologia, intestino, necrose, obstrução.

ABSTRACT

The effects of Carolina Rinse Solution (CRS) in a rabbit model of jejunal reperfusion injury were investigated in this study. Fifteen New Zealand rabbits were allocated to three groups: Sham-operated (A), Ischemia and Reperfusion (B) and CRS (C). Groups B and C were subjected to one hour of ischemia and two hours of reperfusion. In group C, ten minutes prior to reperfusion, the bowel lumen was filled with CRS, and the segment was immersed in CRS. In group C

hemorrhage caused by sample harvesting was difficult to be controlled with suture. In groups B and C necrosis and loss of villi integrity was observed along with time. There was no difference in necrosis of enterocytes from the tip or base of villi. Edema of submucosa and circular muscle was present in all groups and all times. In groups B and C hemorrhage was observed in different layers. According to mean and median values, group C animals showed more intense hemorrhage in some layers, during reperfusion. All groups showed PMN infiltration in the base of mucosa, submucosa and longitudinal muscle. PMN margination was observed in mucosa and submucosa vessels in all groups, during reperfusion. Necrosis of enterocytes, muscles, crypts of Lieberkühn and myenteric plexus was observed in groups B and C, with no significant difference between these groups. Topical and intraluminal CRS did not attenuate deleterious effects of ischemia and reperfusion in small intestinal of rabbits.

Key words: Histology, intestine, necrosis, obstruction.

INTRODUCTION

Intestinal ischemia results from local (mechanical vascular obstruction) or systemic (hypovolemia, hypotension, sepsis) factors (BARIE, 1999). Mechanical obstruction of blood vessels that irrigate the intestine leads to ischemia and intense reduction of oxygenation and tissue perfusion. Intestinal mucosa is highly dependent on energy. Lesion formation and cell death can happen soon if there is substantial decreasing in blood supply (MOORE et al., 1995). Ischemic changes result in necrosis formation, unless blood flow returns in a timely fashion (WHITE, 2003).

However, even if oxygenated blood flow returns abruptly to tissues before cellular death occurs, several biochemical events happen immediately during tissue reperfusion. This is called reperfusion injury and can be initiated by several mechanisms, leading to inflammatory response (WHITE, 2002). Intestinal reperfusion following experimental ischemia can cause changes like increasing in microvascular permeability, mucosal cells detachment, increasing in endothelial cells volume, neutrophil infiltration and lymphatic dilation (MOORE et al., 1994). Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury has been widely associated to cell necrosis, although apoptosis is another distinct biochemical and morphological type of cell death observed (SHAH et al., 1997).

Intestinal I/R has been experimentally described in several different animals like dogs (NEZU et al., 2008), cats (YOUNES et al., 1984), rats (IKEDA et al., 1998) and rabbits (BRETZ et al., 2010). In horses, I/R represents a common acute abdomen condition (MOORE, 1997). Small intestine strangulation obstruction is one important cause of death in this species (WHITE et al., 1980).

In order to protect tissues against reperfusion injury, current treatments include application of several extracellular signaling molecules and manipulation of many signaling pathways (GUAN et al., 2009). With the purpose of minimizing reperfusion injury after liver transplant in rats, Carolina Rinse Solution (CRS), a compound of electrolytes similar to plasma, allopurinol and glutathione as antioxidants, desferrioxamine as an iron chelator, the calcium channel blocker nicardipine, adenosine for improved microcirculation, and fructose and glucose as adenosine triphosphate substrates, was designed by North Carolina University, USA (CURRIN et al., 1990). The solution was experimentally used in jejunal artery of an ischemic intestinal segment of horses, ten minutes prior reperfusion was established, and showed to be beneficial in attenuating changes in capillary permeability and edema formation (DABAREINER et al., 2005).

The present study aimed to investigate the effects of topical and intraluminal CRS in a rabbit model of jejunal ischemia and reperfusion.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Fifteen young adult male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) weighing 2-3.5 kg were housed at the UFG Central Biotherium for 20 days under controlled conditions. Animals were fed with a commercial balanced rabbit diet (doSítio Coelhão®, Guabi Nutrição Animal, Campinas, Brazil), and had free access to water. Rabbits were randomly allocated to three groups of five: Sham-operated (A), Ischemia and reperfusion (B) and Carolina Rinse solution (C).

All procedures were consistent with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian Society for Laboratory Animal Science

(SBCAL, 2006) and the study was approved by the UFG Ethics Committee of Human and Animal Medical Research (protocol number 011/11).

Surgical procedure

In preparation for each surgery, each subject had its abdomen shaved and aseptically prepared. The marginal auricular vein was catheterized with a 22 gauge catheter and anesthesia was induced with 15 to 25 mg/kg sodium thiopental (Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brazil), administered to effect. Maintenance of anesthesia was obtained by continuous infusion (ST670- Syringe Pump, Samtronic, São Paulo, Brazil) of 60mg/kg/hour of 1.25% Thiopental during the first hour, and 40mg/kg/hour during the following hours. Rabbits were intubated using an uncuffed orotracheal tube #2.5 and oxygen was delivered at 300 ml/kg/min. All animals were manually ventilated using a non-rebreathing circuit (Modified Jackson Rees) in order to maintain PECO₂ (partial pressure of expired CO₂) between 35 and 45 mmHg. Rectal temperature was recorded every 10 minutes. Loss of body heat was reduced significantly by placing warm water-filled surgical gloves under animal's bodies. A polyethylene catheter was inserted into the saphenous vein for continuous administration of lactated ringer solution.

A midline incision was made starting caudal from the xiphoid process and extending approximately seven centimeters caudally, thus exposing the bowel. A 10 cm segment of distal jejunum was then chosen for study and the most distal part of its mesenteric artery and vein were then identified. The vessels were isolated and sterile 0.2 mm fishing line nylon monofilament was used to atraumatically bring both vein and artery together into a 2 cm section of polyvinyl urethral tube #4 in order to establish ischemia of the segment. Haemostatic mosquito forceps was used to lock the suture to the tube to ensure there was no blood supply to the isolated bowel segment. Extramural circulation was blocked by tying #2 chromic catgut (Ethicon, Inc, New Brunswick, USA) sutures around the entire circumference of the small bowel at both ends of the segment (Figure 1). After one hour of ischemia, sutures were removed and the isolated segment remained in reperfusion for two hours. During ischemia and reperfusion, in the

interval between specimens harvesting, the segment was carefully replaced into the abdomen along with the tip of the haemostatic forceps and the skin incision was partially closed using cyanoacrylate fast-acting adhesive (Super 1000®, Three Bond do Brasil, Diadema, Brazil) in order to maintain the segment warm and moist.

In group A, jejunum was exteriorized, and samples were harvested without occlusion of mesenteric vessels. In group B, ischemia of the isolated segment was established for one hour and reperfusion for two hours. In group C, ten minutes prior to reperfusion, the lumen of the isolated segment was filled, but not distended with 1 ml/kg body weight of CRS (YOUNG et al., 2002). The segment was also immersed in 30 ml of CRS in a sterile small plastic bag until reperfusion was established. CRS solution was warmed up to 37°C prior to lumen injection and immersion. At the end of the experiments, animals were euthanized with a lethal dose of thiopental.

Samples harvesting and processing

Full-thickness 3mm biopsy specimens were harvested from the anti-mesenteric border of the isolated segment using Metzenbaum scissors. Specimens were harvested in five different time points during surgery:

- T0: Before vascular compromise;
- T5i: 5 minutes after ischemia onset;
- T5r: 5 minutes after reperfusion onset;
- T60r: 60 minutes after reperfusion onset and
- T120r: 120 minutes after reperfusion onset.

In group A samples were harvested at similar times but vessels were not occluded. After sample harvesting the defect was sutured using # 3-0 nylon monofilament (Moura e Draschi Ltda, Goiania, Brazil).

Histology

Biopsy specimens were immediately immersed in buffered 10% formalin, fixed for 24 hours and kept in 70% ethyl alcohol solution until dehydrated and embedded in paraffin. Five micrometers thick sections were mounted onto glass slides, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined through light microscopy (LeicaTM DM 4000B, Germany) on 200, 400 and 1000x magnifications whenever necessary. Representative results were photographed using digital camera (LeicaTM DFC 290, Germany) connected to a light microscope.

Changes evaluated were: edema, polymorphonuclear leukocytes (PMN) infiltration and margination, hemorrhage and necrosis. Jejunal sites assessed were: villi structure, enterocytes, lamina propria, crypts of Lieberkühn, base of mucosa (lamina propria area where crypts are located), submucosa, circular muscle, myenteric plexus and longitudinal muscle.

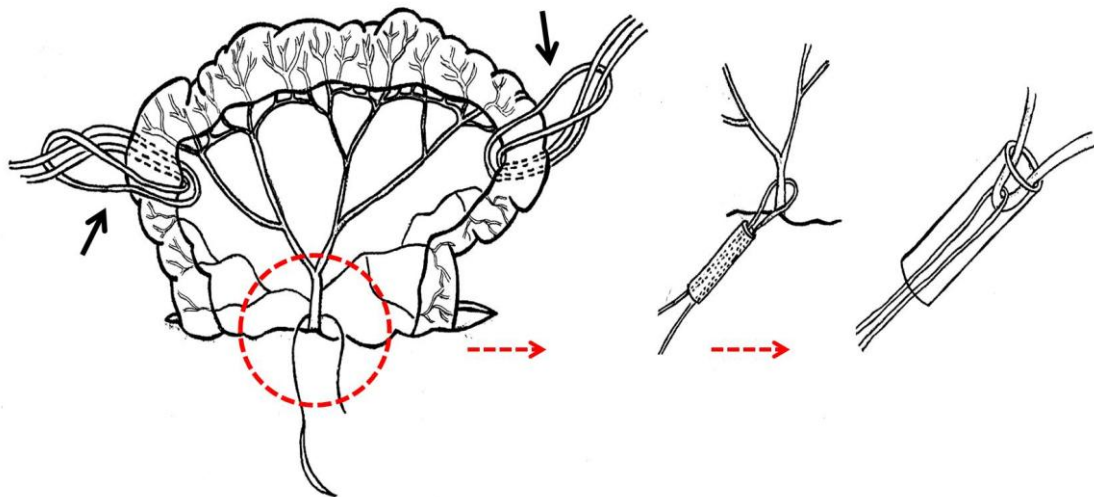


Figure 1- Schematic representation of mesenteric vessels isolated with nylon monofilament into a small section of polyvinyl urethral tube. Extramural circulation blocked with #2 chromic catgut sutures around the small bowel circumference (black arrows).

Data acquisition and statistical analysis

A score was used to evaluate the results (intensity and distribution): 0 for no changes, 1 for mild intensity or focal distribution, 2 for moderate intensity or multifocal distribution and 3 for strong intensity or diffuse distribution. Comparison between groups were analyzed by Kruskal Wallis test, followed by the Student Newman-Keuls multiple comparison test when necessary, using BioEstat software (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Brazil). $P < 0.05$ was considered significant. Mean and median values were used as indicators for central tendency.

RESULTS

Gross changes

The first changes were observed at three minutes of ischemia. All animals showed discoloration of the isolated segment which became more intense over time. After reperfusion was established the segments became hyperemic and presented substantial increasing in intestinal wall thickness. Jejunal veins grew ingurgitated and dark red in color during ischemia. For groups A and B, every time a sample was harvested during reperfusion, some hemorrhage was observed from the incision, but it was easily controlled by suturing the defect. However, in group C, hemorrhage was substantially more difficult to be controlled with suture and, for many instances, additional suturing was necessary.

Microscopic study

Villi integrity was preserved in group A during all time (Figure 2A). Its architecture was severely destroyed with detachment of enterocytes, lamina propria disintegration, and presence of necrotic material after the beginning of reperfusion (Figure 2B) in both groups B and C in a similar fashion. There was no

significant difference in necrosis of enterocytes located at the tip, intermediate area or base of villi. All enterocytes showed diffused necrosis after five minutes of reperfusion. After two hours of reperfusion (T120r), both groups B and C showed similar villus shortening.

Edema was observed mainly in the submucosa and circular muscle layer in all groups, and all times. For both layers, according to the indicators for central tendency, mean and median, edema became more evident after two hours of reperfusion, particularly in group C, although no statistically significant difference was observed. Central tendency values for edema of the myenteric plexus were higher in groups B and C after one hour of reperfusion, but less intense edema was also observed in group A. The longitudinal muscle layer of groups B and C showed significant progressive edema that became intensive after two hours of reperfusion, with no difference between these groups. Edema was also present in this layer in group A, but it was less intense than in groups B and C.

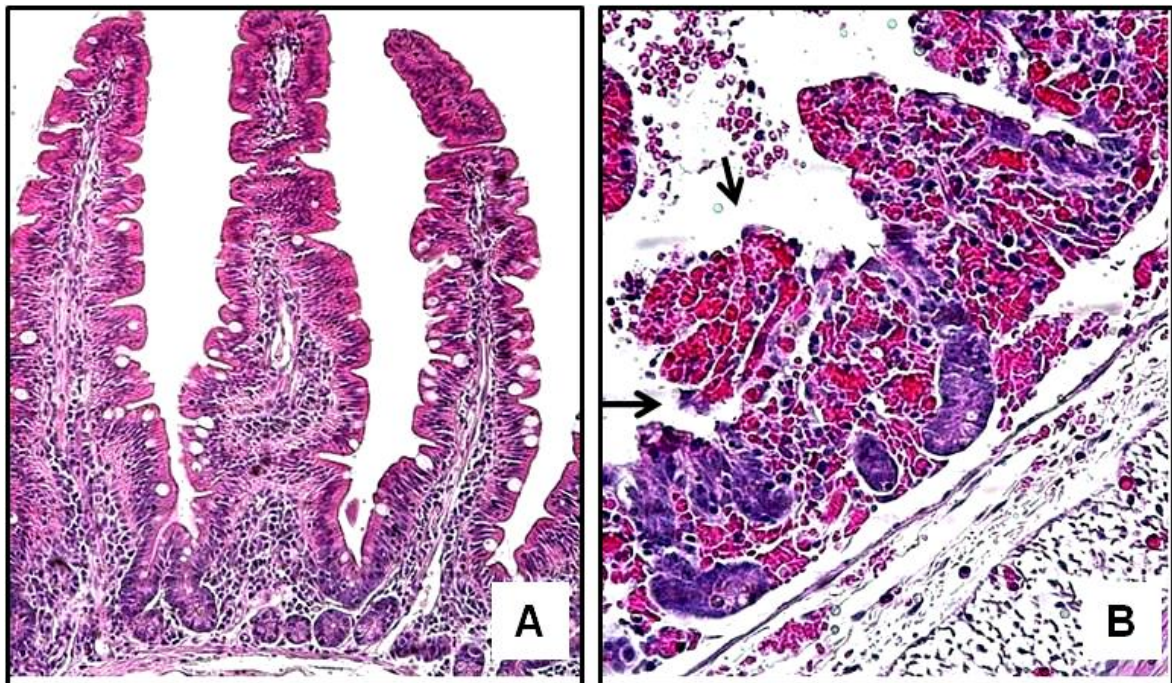


Figure 2- Photomicrographs of isolated rabbit jejunum. (A) T120r sample from group A. Villi integrity preserved. (B) Changes in the mucosa at T60r sample in group B. Note detachment of enterocytes and lamina propria disintegration (arrows). H&E, 200X.

All animals from group A showed no hemorrhage in any intestinal layer of the isolated segment. In groups B and C hemorrhage was observed in the lamina propria, base of mucosa, submucosa (Figure 3A), circular and longitudinal muscle layers (Figure 3B). In groups B and C hemorrhage of the lamina propria was observed shortly after reperfusion. For all other layers, except the submucosa, although the difference was not statistically significant, after reperfusion was established, mean and median values for hemorrhage were higher in group C animals, compared to group B. However, in the submucosa, within two hours of reperfusion, it was evident that hemorrhage was significantly more conspicuous in group C compared to group B.

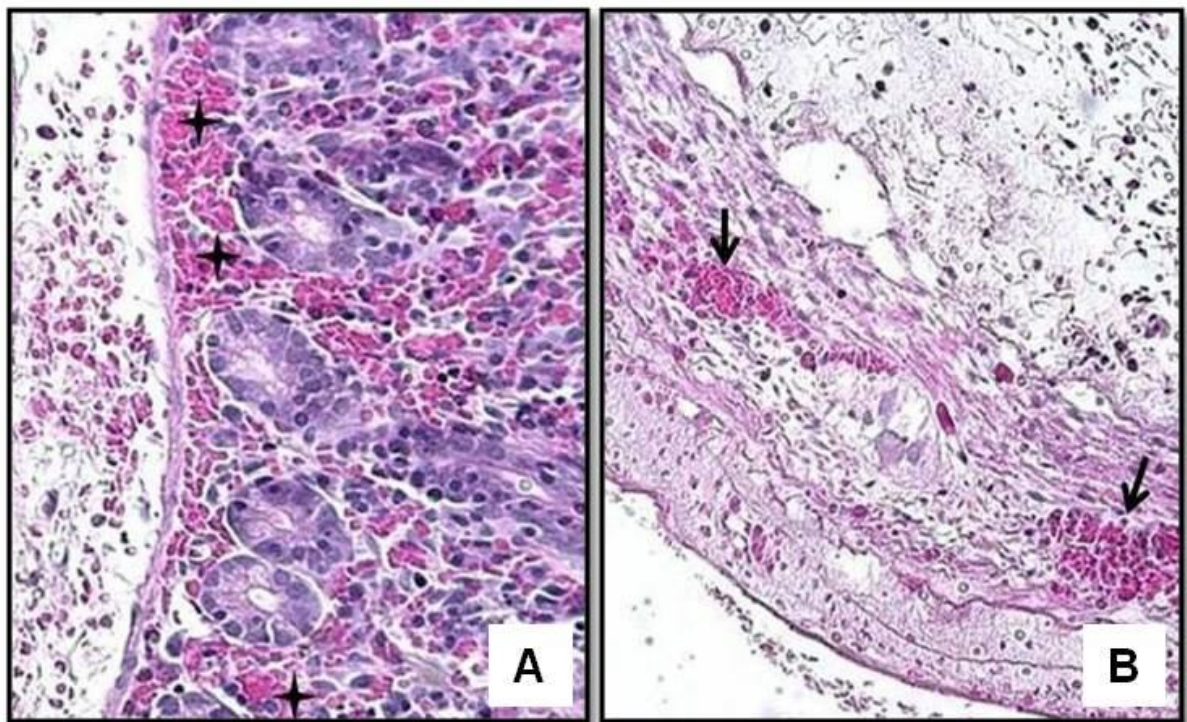


Figure 3- Photomicrographs of isolated rabbit jejunum showing T120r sample from group C. (A) Intense hemorrhage in the base of mucosa (stars). (B) Hemorrhage in muscle layers (arrows). H&E, 200X.

PMN margination was observed at the vessels of the base of mucosa, as well as the submucosa. Both layers showed mild PMN margination in all groups, from the T5r sample. In group B, the base of the mucosa showed significant more intense and diffused margination, five minutes after reperfusion

was established, and in the submucosa, both groups B and C presented significant more intense PMN margination at the T5r sample, as compared to group A, with no difference between groups B and C.

PMN infiltration was observed in all groups and all times in the base of mucosa, with no statistic difference between groups. Mild focal PMN infiltration was observed in longitudinal muscle layer only at the T120r sample in all groups. Circular muscle presented mild PMN infiltration in groups B and C after 60 minutes of reperfusion, and in all groups after two hours of reperfusion, but there was no significant difference between groups.

Only animals from groups B and C showed progressive necrosis of enterocytes, crypts of Lieberkühn, myenteric plexus, circular and longitudinal muscles after reperfusion started, with no significant difference between these groups (Figure 4). However, in the crypts of Lieberkühn, according to mean and median values, necrosis was more evident in group B animals during reperfusion, as compared to group C.

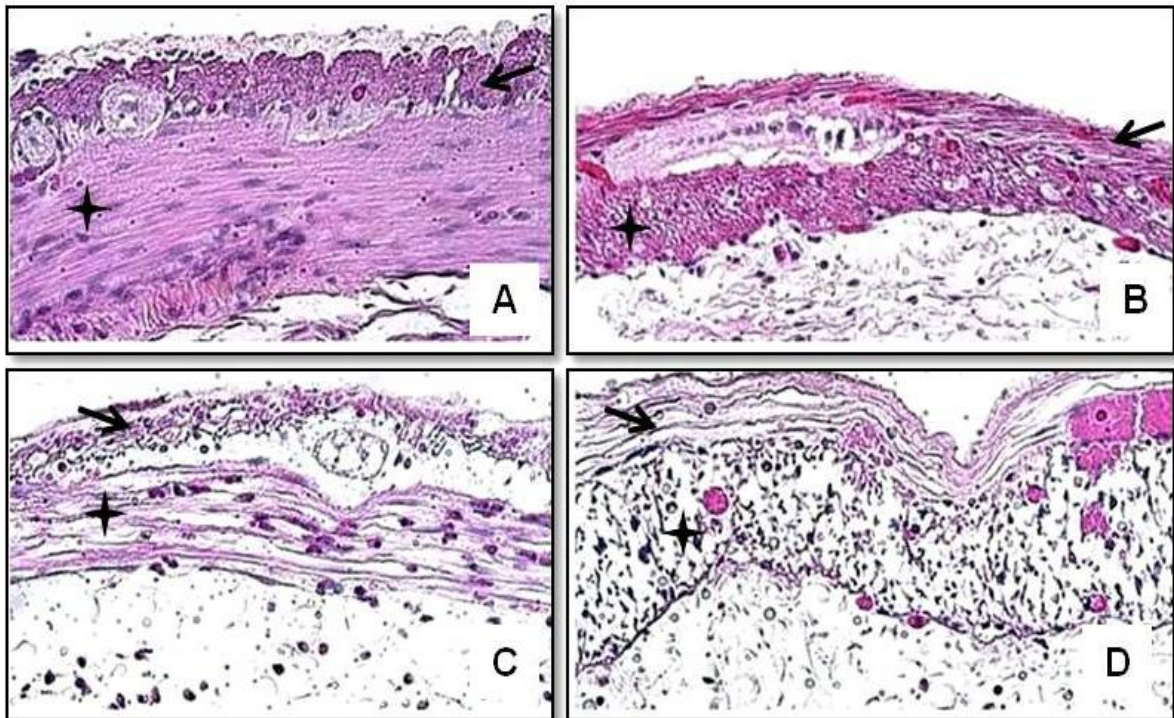


Figure 4- Photomicrographs of isolated rabbit jejunum showing circular (stars) and longitudinal muscle layers (arrows). (A) T5r sample from group A (sham operated); normal aspect. (B) T5r sample from group B; multifocal areas of necrosis. (C) T120r sample from group B; diffused necrosis. (D) T120r sample from group C; diffused necrosis. H&E, 200X.

DISCUSSION

The animal model used in our investigation was selected because of its small bowel anatomy: large, easily accessible, and with a single mesenteric blood supply (O'MAHONY et al., 2007). Surgical technique was delineated based on previous studies (SULLINS et al., 1985; ALVES et al., 2003; ARUMUGAM et al., 2003; O'MAHONY et al., 2007) what resulted in rapid onset of macroscopic changes of the ischemic segment. However, studies conducted in horses are more favorable to show more evident macroscopic changes due to the size of the small intestine and vessels (BRANDSTETTER, 2006).

In this study, time of ischemia was set to one hour. Determining the time of ischemia is important in experimental studies, since microscopic changes in the mucosa occur after 30 minutes of experimental ischemia (WHITE et al., 1980); within one hour the intestinal mucosa shows changes in microvascular permeability, characterized by edema and loss of fluids to intestinal lumen. After more than one hour of ischemia, the mucosa becomes severely damaged, presents ulceration and hemorrhage (GRANGER et al., 1986), and after two hours, intestinal absorptive function is impaired (SCHOENBERG et al., 1984). Previous studies have standardized the time of intestinal ischemia in one hour to prevent tissues from the occurrence of irreversible lesions (BRANDSTETTER, 2006; TOENS et al., 2006; GOMES et al., 2010).

Loss of intestinal villi integrity and detachment of enterocytes occurred in accordance to other reports that described cell separation from lamina propria after one hour of ischemia (CHIU et al., 1970; GOMES et al., 2010). However, other protocols failed to produce such changes in horses after one hour of small intestine ischemia (DABAREINER et al., 1995; BRANDSTETTER, 2006).

Ischemic changes in the metabolically active mucosa are widely graded in a six point scale. At grade 0 no changes can be observed. Grade I is characterized by development of a subepithelial space, and slight epithelial lifting at the villus tip. Changes progress to loss of the epithelial layer in sheets, starting at the villus tip, until complete loss of the villus architecture, with severe mucosal hemorrhage and loss of the lamina propria (grade V) (CHIU et al., 1970). Considering the scale above, lesions in both groups B and C achieved grade IV

(characterized by denuded villi with exposed lamina propria and dilated capillaries) or V after reperfusion was established, but there was no difference between these groups.

It has been shown that enterocytes located at the tips of the villi are more sensitive to the effect of ischemia (KONG et al., 1998). A study in a rat model demonstrated that the sensitivity of an enterocyte is dependent on its state of differentiation (HINNEBUSCH et al., 2002). In this study, there was no significant difference in necrosis of enterocytes located at the tip or base of villi. This might be explained by the diffused necrosis observed after the segment had suffered ischemia for one hour, when villi were already severely compromised.

Progressive edema was observed in the longitudinal muscle layer in both B and C groups. This is a common finding in experimental intestinal I/R due to early changes in capillary permeability during ischemia (HAGLUND, 1994) that becomes more intense during reperfusion. When injured or activated, endothelial cells become turgid, their morphology change and there is increasing in capillary permeability (DABAREINER et al., 1995). In this study, edema of submucosa and circular muscle layer was present in all groups and all times, and there was no significant difference between groups. In a previous study, edema formation has been reported in instrumented control segments, presumably as a result of tissue handling, and maintaining an open abdominal cavity during the procedure (DABAREINER et al., 1995).

Changes in capillary permeability are related to the extravasation of erythrocytes. All animals from group A showed no hemorrhage in any intestinal layer of the isolated segment. Although extravasation of liquid was observed in this group causing edema, the increase in capillary permeability without ischemia and reperfusion insults in that group was probably not sufficient to allow erythrocytes to cross the endothelial barrier. In contrast, hemorrhage was observed in different layers in I/R groups.

The fact that group C showed more intense hemorrhage scores in some layers could be attributed to the effects of one of the CRS compounds. Adenosine is a purine nucleoside and a potent vasodilator in almost all vascular beds, occupies a unique position in regulation of microcirculation, inflammatory response, and neurogenic activity in the gut. Adenosine participates in control of

vascular tone in the rat mesenteric vascular bed (RUBINO et al., 1995) and is a potent inhibitor of platelet aggregation (BORN & CROSS, 1963). It has been reported that adenosine infusion increases blood flow in the upper portions of the gastrointestinal tract (PENNANEN et al., 1994). Therefore, the increase in capillary permeability as a result of I/R injury combined with vasodilation and platelet aggregation inhibition, could increase hemorrhage. This could also explain the difficulty to stop bleeding after sample harvesting during reperfusion in group C.

Intestinal I/R injury has been shown to be associated with intense inflammatory response manifested by releasing of inflammatory mediators (OLSON et al., 1989), and the accumulation of neutrophils during the reperfusion period (HORTON & WALKER, 1993). In this study, all groups showed PMN infiltration in all times in the base of mucosa. PMN infiltration in the base of mucosa of experimental models was described in control groups by SULLINS et al. (1985). Moreover, laparotomy and intestinal manipulation can cause an inflammatory response in the intestine, including leukocytes recruitment depending on the severity of the manipulation (KALFF et al., 1998). Although in this study the intestine was carefully manipulated and parasites were not observed, there was still insult every time the segment had to be exteriorized for sample harvesting. PMN margination in the base of mucosa was more intense in group B at T5r sample harvesting, as compared to group C. One of the known strategies to attenuate leukocyte-mediated I/R injury is to limit leukocyte–endothelial adhesion. Allopurinol appears to reduce leukocyte rolling and adhesion in a dose-dependent manner (RIAZ et al., 2002), which could be related to the results mentioned above, although the difference was observed only in the early stages of reperfusion. Allopurinol is also supposed to prevent increasing in microvascular permeability and neutrophil infiltration (GRISHAM et al., 1986). Since in the present study, PMN infiltration and margination was similar in groups B and C in the submucosa, allopurinol had no such effect.

In the circular and longitudinal muscles necrosis became evident in groups B and C after reperfusion started. There are not many reports about the changes observed in muscle layers of small intestine after ischemia and reperfusion. Moreover, some reports show conflicting results. One study has showed no significant changes in muscle following one hour of ischemia, and up to

ten weeks of reperfusion of the rat small intestine, other than an infiltration of inflammatory cells (LINDESTROM & EKBLAD, 2004). Nevertheless, it has been reported that about 10% of smooth muscle cells show apoptosis at six and 12 hours of reperfusion after one hour of ischemia in the small intestine of guinea pigs (MEI et al., 2009). In this study, there was no difference in necrosis of circular and longitudinal muscles. This result, however, is not in accordance with a recent report that showed prominent degenerative changes in the longitudinal muscle of areas subjected to I/R in rats, in contrast to the circular muscle, which was barely affected (PONTELL et al., 2011).

Myenteric plexus presented progressive necrosis over time during reperfusion, in groups B and C, particularly after two hours of reperfusion. Degenerative changes are expected in enteric neurons, and some neurons are lost following I/R injury (LINDESTROM & EKBLAD, 2004; MEI et al., 2009).

No consistent signs of tissue protection related to CRS were observed after intestinal ischemia and reperfusion. In an earlier study, combined topical and intraluminal CRS was effective in reducing expected neutrophil migration in equine jejunum and was considered a clinically applicable treatment to prevent immediate inflammatory changes during reperfusion after low flow ischemia (YOUNG et al., 2002). However, in that study, the segment was immersed in 1L Carolina Rinse for 60 minutes. In the present work, immersion of intestine for a longer period was not accomplished due to the size of the segment and difficulty to manipulate and maintain it in a plastic bag without solution leakage. Complete interruption of blood flow, associated to the brief topical CRS application time, could explain the lack of favorable results.

There have been many attempts to minimize deleterious effects of intestinal I/R. However, clinical conditions of acute abdomen, which involve intestinal blood flow interruption, are still responsible for drastic numbers in terms of fatality, even when surgical repair and modern treatments are applied. Several researches have showed the benefits of different treatments, but still, no isolated treatment seems to have the necessary efficacy.

CONCLUSION

Brief topical and intraluminal CRS does not attenuate deleterious effects of experimental ischemia and reperfusion in small intestine of rabbits.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Ekaterina Akimova Botovchenco Rivera for animal facility privileges, Dr. Nathaniel White II for advice and Halex Istar Industria Farmacêutica for providing the animals.

REFERENCES

1. ALVES, G. E. S.; MATOS, J. J. R. T.; FALEIROS, R. R.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Efeito da hidrocortisona sobre a lesão de reperfusão e reparação da mucosa após isquemia venosa experimental no jejuno de eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 2003.
2. ARUMUGAM, T. V.; ARNOLD, N.; PROCTOR, L. M.; NEWMAN, M.; REID, R. C.; HANSFORD, K. A.; FAIRLIE, D. P.; SHIELS, I. A.; TAYLOR, S. M. Comparative protection against rat intestinal reperfusion injury by a new inhibitor of sPLA2, COX-1 and COX-2 selective inhibitors, and an LTC4 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 140, n. 1, p. 71-80, 2003.
3. BARIE, P. S. Schemes against ischemia; solutions for reperfusion (injury)? **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 27, n. 4, p. 684-685, 1999.
4. BORN, G. V.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 168, n. p. 178-195, 1963.
5. BRANDSTETTER, L. R. G. **Perfil de ativação das MAP quinases ERK 1/2 no intestino delgado de equinos submetidos à isquemia e reperfusão**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
6. BRETZ, B.; BLAZE, C.; PARRY, N.; KUDEJ, R. K. Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 216-223, 2010.
7. CHIU, C. J.; MCARDLE, A. H.; BROWN, R.; SCOTT, H. J.; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and

metabolic reappraisal. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 101, n. 4, p. 478-483, 1970.

8. CURRIN, R. T.; TOOLE, J. G.; THURMAN, R. G.; LEMASTERS, J. J. Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver. **Transplantation**, New York, v. 50, n. 6, p. 1076-1078, 1990.

9. DABAREINER, R. M.; SNYDER, J. R.; WHITE, N. A.; PASCOE, J. R.; HARMON, F. A.; GARDNER, I.; WOLINER, M. J.; PINNEY, D.; SULLINS, K. E. 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.

10. DABAREINER, R. M.; WHITE, N. A.; SNYDER, J. R.; FELDMAN, B. F.; DONALDSON, L. L. Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and the 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 525-536, 2005.

11. GOMES, O. M.; BRASILEIRO FILHO, G.; PORTO, L. A.; PRATA, P. H.; PAIXAO RDE, M. Ischemia-reperfusion histopathology alterations of the rabbit intestinal wall with and without exclusion of the collateral mesenteric circulation supply. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 318-321, 2010.

12. GRANGER, D. N.; HOLLWARTH, M. E.; PARKS, D. A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum**, Oxford, v. 548, n. p. 47-63, 1986.

13. GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 251, n. 4, p. G567-574, 1986.

14. GUAN, Y.; WORRELL, R. T.; PRITTS, T. A.; MONTROSE, M. H. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. **The American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 1, p. G187-196, 2009.
15. HAGLUND, U. Gut ischaemia. **Gut**, London, v. 35, n. 1 Suppl, p. S73-76, 1994.
16. HINNEBUSCH, B. F.; MA, Q.; HENDERSON, J. W.; SIDDIQUE, A.; ARCHER, S. Y.; HODIN, R. A. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, Berlin, v. 6, n. 3, p. 403-409, 2002.
17. HORTON, J. W.; WALKER, P. B. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 74, n. 4, p. 1515-1520, 1993.
18. IKEDA, H.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, M.; KOIKE, M.; TAMURA, J.; TONG, J.; NOMURA, M.; ITOH, G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. **Gut**, London, v. 42, n. 4, p. 530-537, 1998.
19. KALFF, J. C.; SCHRAUT, W. H.; SIMMONS, R. L.; BAUER, A. J. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 228, n. 5, p. 652-663, 1998.
20. KONG, S. E.; BLENNERHASSETT, L. R.; HEEL, K. A.; MCCAULEY, R. D.; HALL, J. C. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, Sydney, v. 68, n. 8, p. 554-561, 1998.

21. LINDESTROM, L. M.; EKBLAD, E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 49, n. 7-8, p. 1212-1222, 2004.
22. MEI, F.; GUO, S.; HE, Y. T.; ZHU, J.; ZHOU, D. S.; NIU, J. Q.; WANG, H. Z.; TIAN, Y. P. Apoptosis of interstitial cells of Cajal, smooth muscle cells, and enteric neurons induced by intestinal ischemia and reperfusion injury in adult guinea pigs. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 454, n. 4, p. 401-409, 2009.
23. MOORE, R. M. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 211, n. 11, p. 1362-1366, 1997.
24. MOORE, R. M.; BERTONE, A. L.; BAILEY, M. Q.; MUIR, W. W.; BEARD, W. L. Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 55, n. 10, p. 1454-1463, 1994.
25. MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 9, n. 3, p. 115-132, 1995.
26. NEZU, Y.; SHIGIHARA, K.; HARADA, Y.; YOGO, T.; HARA, Y.; TAGAWA, M. Effects of small intestinal ischemia and reperfusion on expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNAs in the jejunum, liver, and lungs of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 69, n. 4, p. 512-518, 2008.
27. O'MAHONY, G. D.; GALLUCCI, M. R.; CORDOVA-FRAGA, T.; BERCH, B.; RICHARDS, W. O.; BRADSHAW, L. A. Biomagnetic investigation of injury currents in rabbit intestinal smooth muscle during mesenteric ischemia and reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 52, n. 1, p. 292-301, 2007.

28. OLSON, C. E.; CHEN, M. C.; AMIRIAN, D. A.; SOLL, A. H. Oxygen metabolites modulate prostaglandin E2 production by isolated gastric mucosal cells. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 256, n. 5 Pt 1, p. G925-930, 1989.
29. PENNANEN, M. F.; BASS, B. L.; DZIKI, A. J.; HARMON, J. W. Adenosine: differential effect on blood flow to subregions of the upper gastrointestinal tract. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 56, n. 5, p. 461-465, 1994.
30. PONTELL, L.; SHARMA, P.; RIVERA, L. R.; THACKER, M.; TAN, Y. H.; BROCK, J. A.; FURNESS, J. B. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 343, n. 2, p. 411-419, 2011.
31. RIAZ, A. A.; WAN, M. X.; SCHAFER, T.; DAWSON, P.; MENDER, M. D.; JEPPSSON, B.; THORLACIUS, H. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. **British Journal of Surgery**, Guildford, v. 89, n. 12, p. 1572-1580, 2002.
32. RUBINO, A.; RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Contribution of P1-(A2b subtype) and P2-purinoceptors to the control of vascular tone in the rat isolated mesenteric arterial bed. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 115, n. 4, p. 648-652, 1995.
33. SBCAL. **Princípios éticos na experimentação animal**, 2006. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. Acesso em: 26 jul 2011.
34. SCHOENBERG, M. H.; MUHL, E.; SELLIN, D.; YOUNES, M.; SCHILDBERG, F. W.; HAGLUND, U. Posthypotensive generation of superoxide free radicals--possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. **Acta Chirurgica Scandinavica**, Stockholm, v. 150, n. 4, p. 301-309, 1984.

35. SHAH, K. A.; SHUREY, S.; GREEN, C. J. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. **Transplantation**, New York, v. 64, n. 10, p. 1393-1397, 1997.
36. SULLINS, K. E.; STASHAK, T. S.; MERO, K. N. Pathologic changes associated with induced small intestinal strangulation obstruction and nonstrangulating infarction in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 913-916, 1985.
37. TOENS, C.; KRONES, C. J.; BLUM, U.; FERNANDEZ, V.; GROMMES, J.; HOELZL, F.; STUMPF, M.; KLINGE, U.; SCHUMPELICK, V. Validation of IC-VIEW fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. **International Journal of Colorectal Disease**, Berlin, v. 21, n. 4, p. 332-338, 2006.
38. WHITE, N. A. Intestinal injury in the horse. In: SMITH, B. P. **Large animal internal medicine**. 3rd ed.ed. St. Louis: Mosby, 2002. p.624-633.
39. WHITE, N. A. Pathology of the small and large intestine. In: CONGRESS ON EQUINE MEDICINE AND SURGERY, 8. 2003, Geneva. **Proceedings**, Ithaca, International veterinary information service, 16 dez. 2003. p. 6. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/geneva/2003/white2/ivis.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2011.
40. WHITE, N. A.; MOORE, J. N.; TRIM, C. M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 193-198, 1980.
41. YOUNES, M.; SCHOENBERG, M. H.; JUNG, H.; FREDHOLM, B. B.; HAGLUND, U.; SCHILDBERG, F. W. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. **Research in Experimental Medicine**, New York, v. 184, n. 4, p. 259-264, 1984.

42. YOUNG, B. L.; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. L.; DABAREINER, R. M.
Treatment of ischaemic jejunum with topical and intraluminal Carolina Rinse.
Equine Veterinary Journal, London, v. 34, n. 5, p. 469-474, 2002.

CAPÍTULO 3- Effect of topical and intraluminal Carolina Rinse Solution in p44/42 and p38 MAPK activation profile in rabbit jejunum after ischemia and reperfusion.

Efeito do uso tópico e intraluminal da Solução de Carolina Rinse no perfil de ativação das MAP quinases p44/42 e p38 no jejuno de coelhos após isquemia e reperfusão.

RESUMO

Na maioria das células as MAP quinases transmitem os sinais mitogênicos e de diferenciação celular. A MAPK p38 está normalmente relacionada à apoptose, enquanto ERK 1/2 tem uma função protetora inibindo a apoptose induzida pela isquemia e reperfusão. Os efeitos do uso tópico e intraluminal da Solução de Carolina Rinse (CRS), no perfil de ativação das MAP quinases p44/42 (ERK) e p38, no jejuno de coelhos após isquemia e reperfusão (I/R) foram investigados neste estudo. Quinze coelhos da raça Nova Zelândia foram alocados em três grupos: Instrumentado (A), Isquemia e Reperfusão (B) e CRS (C). Os grupos B e C foram submetidos a uma hora de isquemia e duas horas de reperfusão. No grupo C, dez minutos antes da reperfusão, o lúmen do segmento isolado foi preenchido com CRS e o segmento foi imerso em CRS até o início da reperfusão. No presente estudo foi observado que a I/R estimulou a fosforilação das MAP quinases p44/42 e p38 em algumas camadas do jejuno. A ativação progressiva de p44/42 ocorreu principalmente nas criptas de Lieberkühn e camadas musculares longitudinal e circular, enquanto p38 foi ativada principalmente no plexo mioentérico e ambas as camadas musculares. Um achado importante foi que todas as camadas que responderam ao insulto da I/R com um aumento da ativação de ERK 1/2 e p38, em todos os grupos, mostraram um baixo nível basal de fosforilação quando comparado àquelas que não responderam ao insulto. Os resultados deste trabalho indicam que o modelo escolhido de uso tópico e intraluminal de CRS não interfere no perfil de ativação de ERK 1/2 e p38 no jejuno de coelhos submetidos à I/R.

Palavras-chave: ativação, ERK 1/2, injúria, intestino.

ABSTRACT

In the majority of cells MAPK will transmit mitogenic and cell differentiation signs. MAPK p38 is usually related to apoptosis, while activated ERK 1/2 have a protection function inhibiting apoptosis induced by ischemia and reperfusion. The effects of topical and intraluminal Carolina Rinse Solution (CRS) in p44/42 (ERK) and p38 MAPK activation profile, in rabbit jejunum after ischemia and reperfusion

(I/R), were investigated in this study. Fifteen New Zealand rabbits were allocated to three groups: Sham-operated (A), Ischemia and reperfusion (B) and CRS (C). Groups B and C were subjected to one hour of ischemia and two hours of reperfusion. In group C, ten minutes prior to reperfusion, the bowel lumen was filled with CRS, and the segment was immersed in CRS until reperfusion onset. In this study I/R stimulated the phosphorylation of the p44/42 MAPK and p38 MAPK pathways in some layers of jejunum. Progressive activation of p44/42 MAPK was chiefly localized to the crypts of Lieberkühn, circular and longitudinal muscle layers, whereas p38 MAPK was prominently activated in myenteric plexus and both muscle layers. Interestingly, all layers that did respond to I/R insult with activation increase of ERK 1/2 and p38, in all groups, showed low baseline phosphorylation levels as compared to those that did not react to the insult. The results of this work indicate that the chosen model of topical and intraluminal CRS does not interfere in ERK 1/2 and p38 activation profile in rabbit jejunum subjected to I/R.

Key words: activation, ERK 1/2, injury, intestine.

INTRODUCTION

In mammalian intestine, ischemia results from local (mechanical vascular obstruction) or systemic (hypovolemia, hypotension, sepsis) factors (BARIE, 1999). Mechanical obstruction of blood vessels that irrigate the intestine leads to ischemia and intense reduction of oxygenation and tissue perfusion (MOORE et al., 1995). Interruption of blood supply results in ischemic injury which rapidly damages metabolically active tissues. However, the reperfusion damage frequently exceeds the original ischemic insult (STALLION et al., 2002).

Intestinal ischemia and reperfusion (I/R) has been experimentally described in several different animals like dogs (NEZU et al., 2008), cats (YOUNES et al., 1984), rats (IKEDA et al., 1998) and rabbits (BRETZ et al., 2010). In horses, I/R represents a common acute abdomen condition (MOORE, 1997). Small intestine strangulation obstruction is one of the most important causes of death in this species (WHITE et al., 1980).

The control of cell division and differentiation is mediated by signaling molecules in cellular surface, which leads to long term changes in gene expression. In the majority of cells, MAP (Mitogen Activated Protein) kinases (MAPK), which are part of a group of cytoplasmic enzymes, will transmit mitogenic and cell differentiation signs (ALIAGA et al., 1999). The MAPK themselves require

dual phosphorylation to become active. There are evidences of MAPK activation during ischemia and reperfusion and its contribution to structural and functional changes in affected organs (ABE et al., 2000). MAPK p38 and JNK are usually related to apoptosis (CROSS et al., 2000), while activated ERK 1/2 (p44/42) have a protection function inhibiting apoptosis induced by ischemia and reperfusion (YUE et al., 2000). Inhibiting p38 activation can attenuate reperfusion injury, reducing apoptosis of intestinal epithelium and enhancing epithelial barrier function (ZHENG et al., 2005).

Carolina Rinse Solution (CRS), a compound of electrolytes similar to plasma, allopurinol and glutathione as antioxidants, desferrioxamine as an iron chelator, the calcium channel blocker nicardipine, adenosine for improved microcirculation, and fructose and glucose as adenosine triphosphate substrates, was designed by North Carolina University, USA, with the purpose of minimizing reperfusion injury after liver transplant in rats (CURRIN et al., 1990). The solution was experimentally used in jejunal artery of an ischemic intestinal segment of horses, ten minutes prior reperfusion was established, and showed to be beneficial in attenuating changes in capillary permeability and edema formation (DABAREINER et al., 2005).

The present study has aimed to investigate p38 and ERK 1/2 MAPK activation profile in a rabbit model of jejunal ischemia and reperfusion, and also to verify the influence of CRS in both enzymes activation.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Fifteen young adult male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) weighing 2-3.5 kg were housed at the UFG Central Biotherium for 20 days under controlled conditions. Animals were fed with a commercial balanced rabbit diet (doSítio Coelhão®, Guabi Nutrição Animal, Campinas, Brazil), and had free access to water. Rabbits were randomly allocated to three groups of five: Sham-operated (A), Ischemia and reperfusion (B), Carolina Rinse solution (C).

All procedures were consistent with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL, 2006) and the study was approved by the UFG Ethics Committee of Human and Animal Medical Research (protocol number 011/11).

Surgical procedure

In preparation for each surgery, each subject had its abdomen shaved and aseptically prepared. The marginal auricular vein was catheterized with a 22 gauge catheter and anesthesia was induced with 15 to 25 mg/kg sodium thiopental (Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brazil), administered to effect. Maintenance of anesthesia was obtained by continuous infusion (ST670- Syringe Pump, Samtronic, São Paulo, Brazil) of 60mg/kg/hour of 1.25% Thiopental during the first hour, and 40mg/kg/hour during the following hours. Rabbits were intubated using an uncuffed orotracheal tube #2.5 and oxygen was delivered at 300 ml/kg/min. All animals were manually ventilated using a non-rebreathing circuit (Modified Jackson Rees) in order to maintain PECO₂ (partial pressure of expired CO₂) between 35 and 45 mmHg. Rectal temperature was recorded every 10 minutes. Loss of body heat was reduced significantly by placing warm water-filled surgical gloves under animal's bodies. A polyethylene catheter was inserted into the saphenous vein for continuous administration of lactated ringer solution.

A midline incision was made starting caudal from the xiphoid process and extending approximately seven centimeters caudally, thus exposing the bowel. A 10 cm segment of distal jejunum was then chosen for study and the most distal part of its mesenteric artery and vein were then identified. The vessels were isolated and sterile 0.2 mm fishing line nylon monofilament was used to atraumatically bring both vein and artery together into a 2 cm section of polyvinyl urethral tube #4 in order to establish ischemia of the segment. Haemostatic mosquito forceps was used to lock the suture to the tube to ensure there was no blood supply to the isolated bowel segment. Extramural circulation was blocked by tying #2 chromic catgut (Ethicon, Inc, New Brunswick, USA) sutures around the entire circumference of the small bowel at both ends of the segment. After one

hour of ischemia, sutures were removed and the isolated segment remained in reperfusion for two hours. During ischemia and reperfusion, in the interval between specimens harvesting, the segment was carefully replaced into the abdomen along with the tip of the haemostatic forceps and the skin incision was partially closed using cyanoacrylate fast-acting adhesive (Super 1000®, Three Bond do Brasil, Diadema, Brazil) in order to maintain the segment warm and moist.

In group A, jejunum was exteriorized, and samples were harvested without occlusion of mesenteric vessels. In group B, ischemia of the isolated segment was established for one hour and reperfusion for two hours. In group C, ten minutes prior to reperfusion, the lumen of the isolated segment was filled, but not distended with 1 ml/kg body weight of CRS (YOUNG et al., 2002). The segment was also immersed in 30 ml of CRS in a sterile small plastic bag until reperfusion was established. CRS solution was warmed up to 37°C prior to lumen injection and immersion. At the end of the experiments, animals were euthanized with a lethal dose of thiopental.

Samples harvesting and processing

Full-thickness 3mm biopsy specimens were harvested from the anti-mesenteric border of the isolated segment using Metzenbaum scissors. Specimens were harvested in five different time points during surgery:

- T0: Before vascular compromise;
- T5i: 5 minutes after ischemia onset;
- T5r: 5 minutes after reperfusion onset;
- T60r: 60 minutes after reperfusion onset and
- T120r: 120 minutes after reperfusion onset.

In group A samples were harvested at similar times but vessels were not occluded. After sample harvesting the defect was sutured using # 3-0 nylon monofilament (Moura e Draschi Ltda, Goiania, Brazil).

Immunohistochemistry

Biopsy specimens were immediately immersed in buffered 10% formalin, fixed for 24 hours and kept in 70% ethyl alcohol solution until dehydrated and embedded in paraffin. Five micrometers thick sections were mounted onto glass slides and subjected to immunohistochemistry. Sections were deparaffinized, hydrated and endogenous peroxidase activity was blocked using 10% hydrogen peroxide (H_2O_2) diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS) for 15 minutes. Epitopes were retrieved using citrate buffer (pH 6,0) in a pressure cooker for six minutes after boiling started and 3% bovine serum albumin (BSA) was added to block unspecific bindings. The tissues were then incubated overnight in a humid chamber at 4°C with either mouse monoclonal phospho-ERK 1/2 (1:4000) or phospho-p38 (1:2000) antibodies. Primary antibodies clones used were p-ERK (E-4): sc-7383 and p-p38 (D-8): sc-7973 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA). Secondary antibody incubation was achieved by using Labeled streptavidin biotin (LSABTM + System-HRP, Dako, Carpinteria, California, USA). In order to immunolocalize the antigens, chromogen 3,3'-diaminobenzidine (Liquid DAB Substrate Chromogen System®, Dako, Carpinteria, California, USA) development was performed for three minutes. Sections were dehydrated and glass coverslips were fixed with toluenepyccolyte polymers solution (PermOUNT Mounting Medium®, Proscitech, Kirwan, Australia).

Data acquisition and statistical analysis

Digital images of the sections revealed by DAB-peroxidase were obtained with a 20x objective (LeicaTM DM 4000 B, Germany) and analyzed for optical density of phospho-p44/42 and phospho-p38 MAPK labeling using semi-automatic software Image Processing and Analysis in Java (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). The following jejunal areas were evaluated separately: lamina propria, crypts of Lieberkühn, circular muscle, myenteric plexus and longitudinal muscle. Comparison between groups and times was analyzed by Kruskal Wallis test, followed by the Student Newman-Keuls

multiple comparison test using BioEstat software (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Brazil). $P < 0.05$ was considered significant. Mean values were used as indicators for central tendency.

RESULTS

In the lamina propria and crypts of Lieberkühn, activation of p38 was not significantly different between groups and there was no progressive activation in any group. However, in these layers, basal activation level was considerably higher than in other layers, in all time points in all groups (Figures 1A and 1B).

In the myenteric plexus, progressive activation of p38 was observed in all groups. Although there was no statistically significant difference between groups, group B achieved highest mean level of activation after one hour and two hours of reperfusion (Figure 1E).

After reperfusion was established, the activation of p38 in both circular and longitudinal muscles increased progressively. Labeling was significantly higher in groups B and C, as compared to group A after one hour of reperfusion, although there was no difference between groups B and C. There was no time course difference in p38 activation in group A, and levels remained low within two hours of reperfusion (Figures 1C and 1D).

The basal level of ERK 1/2 activation in the crypts of Lieberkhun was moderate for all groups at the T0 sample. In group A, activation increased until the T5i time point, and after that, decreased and remained in a low basal level. In groups B and C, activation increased progressively in this layer and reached a peak during reperfusion and then decreased slowly and progressively. However, although in group C the level of activation was lower than in group B all time, there was no statistic difference between both groups. After two hours of reperfusion, ERK 1/2 activation was very similar in groups A and C (Figure 2B).

In the lamina propria and myenteric plexus, no difference in activation of ERK 1/2 was observed between groups. However, in these layers, the basal activation levels in all groups, and all times, were considerably higher than in other layers, particularly in myenteric plexus (Figures 2A and 2E).

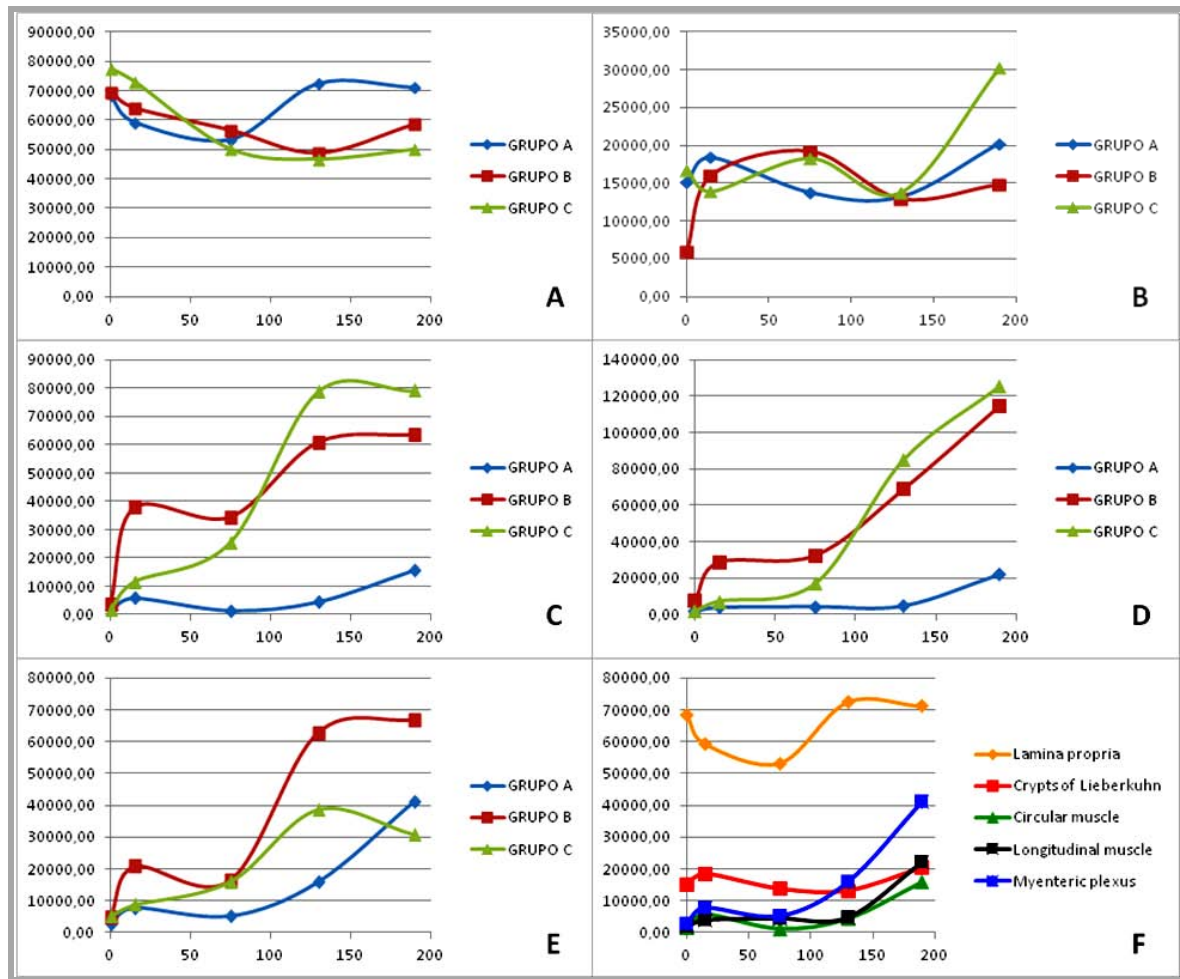


Figure 1- Mean optical density of phospho-p38 indicating central tendency in different layers of rabbit jejunum, in different groups. (A) Lamina propria; (B) Crypts of Lieberkuhn; (C) Circular muscle; (D) Longitudinal muscle; (E) Myenteric plexus; (F) All layers from group A (sham operated).

In both circular and longitudinal muscles, from the T0 time point, ERK activation increased significantly and reached a peak after one hour of reperfusion (T60r time point) in groups B and C, but there was no difference between these groups. After one hour of reperfusion, the activation levels decreased slowly. In group A, kinase activation remained low throughout the experimental procedure (Figures 2C and 2D). Representative images of immunostaining for phospho-P44/42 are shown in figure 3.

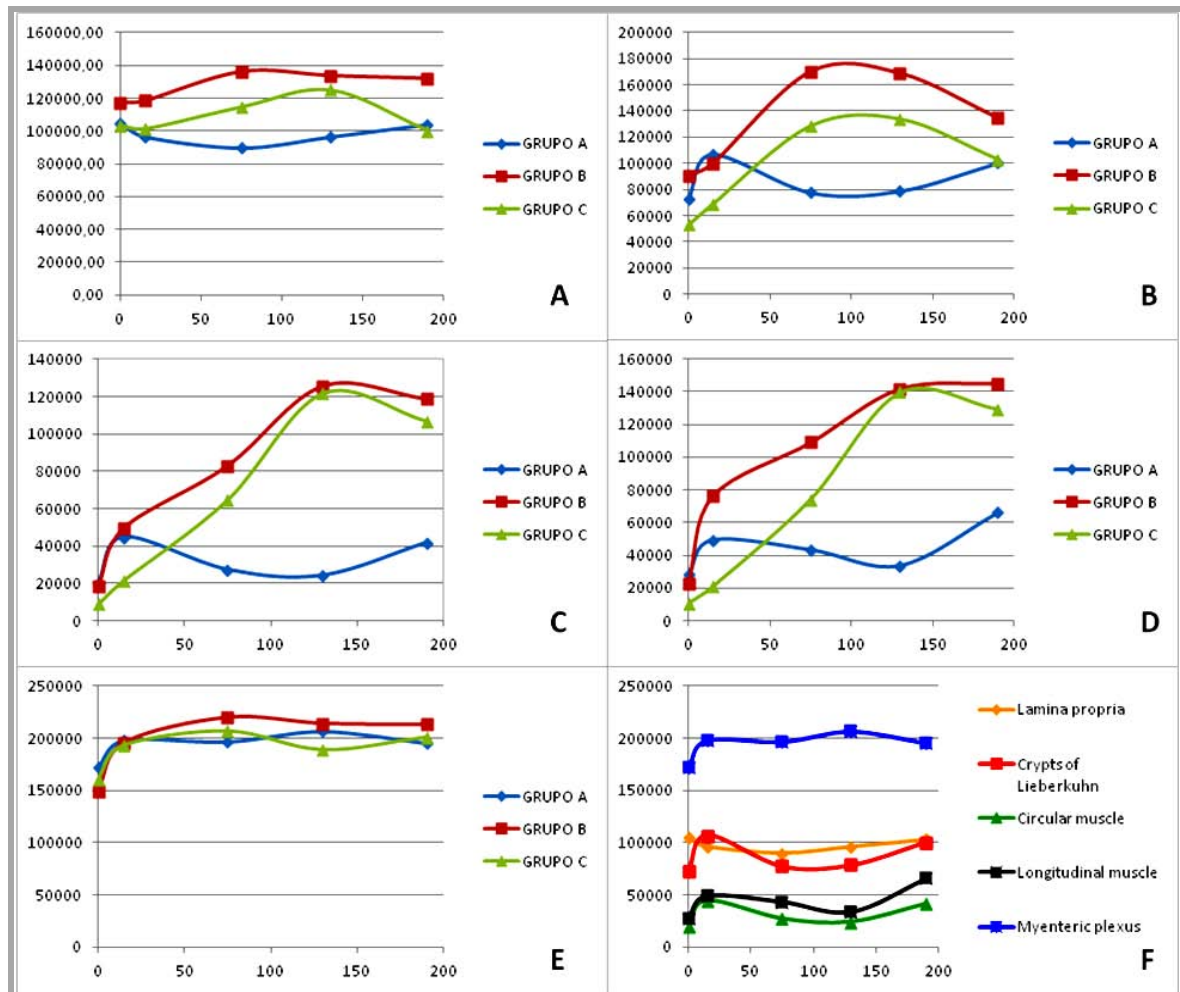


Figure 2- Mean optical density of phospho-p44/42 indicating central tendency in different layers of rabbit jejunum, in different groups. (A) Lamina propria; (B) Crypts of Lieberkuhn; (C) Circular muscle; (D) Longitudinal muscle; (E) Myenteric plexus; (F) All layers from group A (sham operated).

DISCUSSION

The animal model used in our investigation was selected because of its small bowel anatomy: large, easily accessible, and with a single mesenteric blood supply (O'MAHONY et al., 2007). Surgical technique was delineated based on previous studies (SULLINS et al., 1985; ALVES et al., 2003; ARUMUGAM et al., 2003; O'MAHONY et al., 2007) what resulted in rapid onset of macroscopic changes of the ischemic segment. However, studies conducted in horses are more

favorable to show more evident macroscopic changes due to the size of the small intestine and vessels (BRANDSTETTER, 2006).

The present study has delineated the activation profile of ERK 1/2 and p38 in jejunum of rabbits subjected to intestinal ischemia and reperfusion. I/R stimulated the phosphorylation of the p44/p42 (ERK) MAPK and p38 MAPK pathways in some layers of jejunum. Progressive activation of p44/42 MAPK in response to ischemia and reperfusion was chiefly localized to the crypts of Lieberkühn, circular and longitudinal muscle layers, whereas p38 MAPK was prominently activated in myenteric plexus and both muscle layers. Interestingly, all layers that did respond to I/R insult with activation increase of ERK 1/2 and p38, in all groups, showed low baseline phosphorylation levels as compared to those that did not react to the insult (Figures 1F and 2F). ERK 1/2 and p38 activity profiles, in different layers of rabbit jejunum observed in this study, point to the oscillation of phosphorylation in response to ischemia and reperfusion insult. Similar variation was previously described in cardiopulmonary bypass in pigs (ARAUJO et al., 2001).

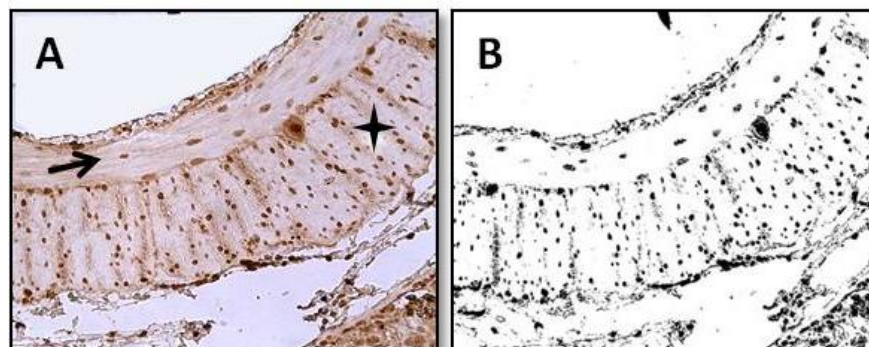


Figure 3- (A) Immunostaining for phospho-P44/42 in circular (star) and longitudinal (arrow) muscle layers of rabbit jejunum and (B) corresponding black and white image converted by Image J software for measurement of percentage fraction area (particle analysis). T60r sample from group A. 200X.

Due to intense edema, hemorrhage, lack of cellularity in many areas with edema and PMN infiltration in the submucosa, in some instances, optical density could not be adequately measured. Thus, the results from this layer were excluded from this work.

Primary antibodies used in this study were directed against the phosphorylated (active) forms of p38 and p44/42 MAPKs. Activation of p38 in the lamina propria and crypts of Lieberkühn was not significantly different when comparing groups and no progressive activation was observed in any group. However, in these layers, from the T0 time point, in all groups, the basal levels of activation were moderately high. It has been shown that p38 expression is related to the differentiation of intestinal crypts and villi (HOUDE et al., 2001) and, in normal rat small intestinal cells, phosphorylated forms of p38 were identified in crypts, mainly in the cytoplasm, and very few in the nuclei (FU et al., 2003a). Growth factors like vascular endothelial growth factor (VEGF) were found to trigger p38 activation in certain cell types (ROUSSEAU et al., 1997). In this study, the presence of many vessels in the lamina propria might be related to the constitutive levels related in these layers, although no increasing in p38 activation was observed during ischemia and reperfusion.

High expression of phospho-p38 MAPK in neurons of rabbit duodenum has been observed in a recent study (GONZALO et al., 2010). However, in the present study, activation level was low in the beginning of the procedure and increased progressively, reaching high intensity in all groups at the T120r time point. It has been reported that surgical manipulation is capable of inducing oxidative stress (ANUP et al., 1999), a fact that could explain progressive activation of p38 also in the sham operated group. However, although progressive activation was observed in all groups, after one hour of reperfusion, it started to decrease in group C, and reached slightly lower levels than group A. Previous work showed that p38 is tissue specific (FU et al., 2003a) and the MAPK pathways respond differently to ischemic injury in different sites (FU et al., 2003b). Such different response pattern could partially explain why myenteric plexus is the only tissue that showed lower mean levels of activation in group C.

Low basal levels of p38 expression in intestinal smooth muscle layers as observed in group A, were previously reported (GONZALO et al., 2010). The significant increase in activation in both muscle layers observed after reperfusion are in accordance to other studies that showed that intestinal ischemia alone cannot activate significantly the p38 pathway, but ischemia and reperfusion can (FU et al., 2003a) with involvement of oxygen free radicals (LI et al., 2006). In the

present study, there was no difference between groups B and C, showing that Carolina Rinse Solution might not have influenced p38 activation.

Activated ERK 1/2 expression in myenteric plexus was conspicuous from the T0 time point, in all groups. High basal levels of ERK 1/2 activation in myenteric plexus of rabbits were recently described (GONZALO et al., 2011). In the present study, ischemia initially produced mild increase in mean ERK activation levels in this layer; peak activation was reached after five minutes of ischemia, and plateaued throughout the procedure. Such results were similar to those observed in the myenteric plexus of equine jejunum subjected to ischemia and reperfusion (BRANDSTETTER, 2006).

Selected cytokines play an important role in ERK activities. *In vitro* studies have shown that some elements of myenteric plexus and longitudinal muscle secrete pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (KHAN & COLLINS, 1994). IL-1 β induces interleukin-8 (IL-8) secretion in neuronal cells through a mechanism dependent on intracellular signal transduction of ERK 1/2 and p38; in other words, there is evidence of ERK 1/2 and p38 involvement in IL-8 secretion (TIXIER et al., 2005). ERK 1/2 activation seems to have neuroprotective effects, besides mediating several extrinsic signals of neural cells survival (HETMAN & GOZDZ, 2004) and that could partly concur for the high constitutive level of activated ERK 1/2 in these cells.

Activated ERK 1/2 expression in lamina propria was also elevated from the T0 time point in all groups. Ischemia and reperfusion did not implicate in any significant difference in phosphorylation patterns of the enzyme in this layer. Again, the lamina propria blood vessels could be implicated in the upraised basal levels of activation observed, possibly due to the capacity of these cells to secrete a myriad of growth and angiogenic factors (LIU et al., 2001).

Proliferative cells reside in the crypts of Lieberkühn (VAN DER FLIER & CLEVERS, 2009). ERKs are activated in response to growth factors stimuli, which are essential to cell differentiation and proliferation (MANSOUR et al., 1994). Also, it has been reported that activation of ERK signaling pathways is related to cell survival (XIA et al., 1995). This might explain that basal levels of ERK 1/2 activation in the crypts were moderate even in group A (sham operated). The

progressive ischemia related increase in ERK 1/2 phosphorylation in groups B and C was in accordance with previous observation of ERK 1/2 activation in response to ischemic stress in many different cell types (EL-ASSAL & BESNER, 2005).

Activation of ERK 1/2 in longitudinal and circular muscles remained low in group A at all time points. Slight expression of ERK in smooth muscle of rabbit small intestine was described before (GONZALO et al., 2011). In groups B and C, activation of ERK 1/2 in muscles was evident and increased progressively after ischemia insult, showing similar response to ischemic stress related in previous studies (EL-ASSAL & BESNER, 2005; BRANDSTETTER, 2006).

Xantine oxidase (XO), a product of xantine dehydrogenase (XD) conversion, generates reactive oxygen species (DABAREINER et al., 2005). Induction of apoptosis by XO is mediated, in part, by activation of p38 (KOU et al., 2008). Allopurinol is a XO inhibitor and effective in scavenging hydroxyl radicals (KAJI et al., 2009). Activation of Src (protein tyrosine kinase that plays critical roles in signaling) is required for p38 MAPK activation and is also inhibited by allopurinol and deferoxamine (WANG et al., 2003), suggesting that both CRS compounds could play a role in modulation of p38 activation. However, the effects of allopurinol are dose dependent. Low doses can effectively inhibit XO, but are probably ineffective in scavenging hydroxyl radicals. Also, the route and duration of drug administration can potentiate the beneficial effects (TERZI et al., 2001). In our study, allopurinol was used intraluminal and as a rinse solution. The duration of drug activities can be questioned and might explain the lack of change in p38 activation profiles.

The amount of extracellular adenosine is known to increase dramatically during ischemia (MATTHEWS et al., 1995). Adenosine has been postulated to have an important role in cellular protection during ischemic insult (OLAFSSON et al., 1987), and also to be important in ischemic stress signaling. In some model systems of ischemic stress, adenosine mediated signaling has been demonstrated to lead to an increase in ERK 1/2 activation (YOO et al., 2001). The presence of extracellular adenosine is essential for maximal ERK 1/2 activation. However, supplemental adenosine does not lead to an additional increase in ERK 1/2 activation during reperfusion (MAMMEN, 2009). In the present study, topical and intraluminal adenosine apparently had no effect in p38 and ERK 1/2 activation.

The results of this work indicate that the chosen model of topical and intraluminal CRS does not interfere in ERK 1/2 and p38 activation profile in rabbit jejunum subjected to ischemia and reperfusion. Further studies unfold beneficial effects of Carolina Rinse Solution in reperfusion injury related to a modulation of ERK 1/2 and p38 phosphorylation. Although some CRS compounds have been proven to interfere in some MAPK activities, the experimental model and application mode of CRS in this study did not elicit any changes in ERK 1/2 or p38 activation profiles.

CONCLUSION

Brief topical and intraluminal CRS does not interfere in ERK 1/2 and p38 activation profile in small intestine of rabbits subjected to experimental ischemia and reperfusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Ekaterina Akimova Botovchenco Rivera for animal facility privileges and Halex Istar Industria Farmacêutica for providing the animals.

REFERENCES

1. ABE, J.; BAINES, C. P.; BERK, B. C. Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury: the good and the bad. **Circulation Research**, Baltimore, v. 86, n. 6, p. 607-609, 2000.
2. ALIAGA, J. C.; DESCHÊNES, C.; BEAULIEU, J.; CALVO, E. L.; RIVARD, N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. n. p. G631- G641, 1999.
3. ALVES, G. E. S.; MATOS, J. J. R. T.; FALEIROS, R. R.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Efeito da hidrocortisona sobre a lesão de reperfusão e reparação da mucosa após isquemia venosa experimental no jejuno de eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 2003.
4. ANUP, R.; APARNA, V.; PULIMOOD, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Surgical stress and the small intestine: role of oxygen free radicals. **Surgery**, Philadelphia, v. 125, n. 5, p. 560-569, 1999.
5. ARAUJO, E. G.; BIANCHI, C.; FARO, R.; SELLKE, F. W. Oscillation in the activities of MEK/ERK1/2 during cardiopulmonary bypass in pigs. **Surgery**, Philadelphia, v. 130, n. 2, p. 182-191, 2001.
6. ARUMUGAM, T. V.; ARNOLD, N.; PROCTOR, L. M.; NEWMAN, M.; REID, R. C.; HANSFORD, K. A.; FAIRLIE, D. P.; SHIELS, I. A.; TAYLOR, S. M. Comparative protection against rat intestinal reperfusion injury by a new inhibitor of sPLA2, COX-1 and COX-2 selective inhibitors, and an LTC4 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 140, n. 1, p. 71-80, 2003.

7. BARIE, P. S. Schemes against ischemia; solutions for reperfusion (injury)? **Critical Care Medicine**, Baltimore, v. 27, n. 4, p. 684-685, 1999.
8. BRANDSTETTER, L. R. G. **Perfil de ativação das MAP quinases ERK 1/2 no intestino delgado de equinos submetidos à isquemia e reperfusão**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
9. BRETZ, B.; BLAZE, C.; PARRY, N.; KUDEJ, R. K. Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 216-223, 2010.
10. CROSS, T. G.; SCHEEL-TOELLNER, D.; HENRIQUEZ, N. V.; DEACON, E.; SALMON, M.; LORD, J. M. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 34-41, 2000.
11. CURRIN, R. T.; TOOLE, J. G.; THURMAN, R. G.; LEMASTERS, J. J. Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver. **Transplantation**, New York, v. 50, n. 6, p. 1076-1078, 1990.
12. DABAREINER, R. M.; WHITE, N. A.; SNYDER, J. R.; FELDMAN, B. F.; DONALDSON, L. L. Effects of Carolina rinse solution, dimethyl sulfoxide, and the 21-aminosteroid, U-74389G, on microvascular permeability and morphology of the equine jejunum after low-flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 66, n. 3, p. 525-536, 2005.
13. EL-ASSAL, O. N.; BESNER, G. E. HB-EGF enhances restitution after intestinal ischemia/reperfusion via PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 activation. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 129, n. 2, p. 609-625, 2005.
14. FU, X. B.; XING, F.; YANG, Y. H.; SUN, T. Z.; GUO, B. C. Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase and its relationship with

localization of intestinal stem cells in rats after ischemia-reperfusion injury. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 9, n. 9, p. 2036-2039, 2003a.

15. FU, X. B.; YANG, Y. H.; SUN, T. Z.; CHEN, W.; LI, J. Y.; SHENG, Z. Y. Rapid mitogen-activated protein kinase by basic fibroblast growth factor in rat intestine after ischemia/reperfusion injury. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 9, n. 6, p. 1312-1317, 2003b.

16. GONZALO, S.; GRASA, L.; ARRUEBO, M. P.; PLAZA, M. A.; MURILLO, M. D. Inhibition of p38 MAPK improves intestinal disturbances and oxidative stress induced in a rabbit endotoxemia model. **Neurogastroenterology & Motility**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 564-572, e123, 2010.

17. GONZALO, S.; GRASA, L.; ARRUEBO, M. P.; PLAZA, M. A.; MURILLO, M. D. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) is involved in LPS-induced disturbances in intestinal motility. **Neurogastroenterology & Motility**, Oxford, v. 23, n. 2, p. e80-90, 2011.

18. HETMAN, M.; GOZDZ, A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 271, n. 11, p. 2050-2055, 2004.

19. HOUDE, M.; LAPRISE, P.; JEAN, D.; BLAIS, M.; ASSELIN, C.; RIVARD, N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 24, p. 21885-21894, 2001.

20. IKEDA, H.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, M.; KOIKE, M.; TAMURA, J.; TONG, J.; NOMURA, M.; ITOH, G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. **Gut**, London, v. 42, n. 4, p. 530-537, 1998.

21. KAJI, H.; INUKAI, Y.; MAIGUMA, T.; ONO, H.; TESHIMA, D.; HIRAMOTO, K.; MAKINO, K. Radical scavenging activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids and traditional prophylactics against chemotherapy-induced oral mucositis. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 197-205, 2009.

22. KHAN, I.; COLLINS, S. M. Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 107, n. 3, p. 691-700, 1994.

23. KOU, B.; NI, J.; VATISH, M.; SINGER, D. R. Xanthine oxidase interaction with vascular endothelial growth factor in human endothelial cell angiogenesis. **Microcirculation**, New York, v. 15, n. 3, p. 251-267, 2008.

24. LI, Z.; MA, J. Y.; KERR, I.; CHAKRAVARTY, S.; DUGAR, S.; SCHREINER, G.; PROTTER, A. A. Selective inhibition of p38alpha MAPK improves cardiac function and reduces myocardial apoptosis in rat model of myocardial injury. **The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 291, n. 4, p. H1972-1977, 2006.

25. LIU, S.; YU, D.; XU, Z. P.; RIORDAN, J. F.; HU, G. F. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 287, n. 1, p. 305-310, 2001.

26. MAMMEN, J. M. V. **Ischemia/Reperfusion Injury in the Intestine: Important Roles for PKC, MAPK, and Adenosine**. 2009. 121 f. Thesis (PhD in Molecular and Cellular Physiology) - Department of Molecular and Cellular Physiology of the College Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati.

27. MANSOUR, S. J.; MATTEN, W. T.; HERMANN, A. S.; CANDIA, J. M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE WOUDE, G. F.; AHN, N. G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science**, Washington, v. 265, n. 5174, p. 966-970, 1994.

28. MATTHEWS, J. B.; TALLY, K. J.; SMITH, J. A.; ZEIND, A. J.; HRNJEZ, B. J. Activation of Cl secretion during chemical hypoxia by endogenous release of adenosine in intestinal epithelial monolayers. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 96, n. 1, p. 117-125, 1995.
29. MOORE, R. M. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 211, n. 11, p. 1362-1366, 1997.
30. MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 9, n. 3, p. 115-132, 1995.
31. NEZU, Y.; SHIGIHARA, K.; HARADA, Y.; YOGO, T.; HARA, Y.; TAGAWA, M. Effects of small intestinal ischemia and reperfusion on expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 messenger RNAs in the jejunum, liver, and lungs of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 69, n. 4, p. 512-518, 2008.
32. O'MAHONY, G. D.; GALLUCCI, M. R.; CORDOVA-FRAGA, T.; BERCH, B.; RICHARDS, W. O.; BRADSHAW, L. A. Biomagnetic investigation of injury currents in rabbit intestinal smooth muscle during mesenteric ischemia and reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 52, n. 1, p. 292-301, 2007.
33. OLAFSSON, B.; FORMAN, M. B.; PUETT, D. W.; POU, A.; CATES, C. U.; FRIESINGER, G. C.; VIRMANI, R. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. **Circulation**, Baltimore, v. 76, n. 5, p. 1135-1145, 1987.
34. ROUSSEAU, S.; HOULE, F.; LANDRY, J.; HUOT, J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and

cell migration in human endothelial cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 15, n. 18, p. 2169-2177, 1997.

35. SBCAL. **Princípios éticos na experimentação animal**, 2006. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. Acesso em: 26 jul 2011.

36. STALLION, A.; KOU, T. D.; MILLER, K. A.; DAHMS, B. B.; DUDGEON, D. L.; LEVINE, A. D. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 105, n. 2, p. 145-152, 2002.

37. SULLINS, K. E.; STASHAK, T. S.; MERO, K. N. Pathologic changes associated with induced small intestinal strangulation obstruction and nonstrangulating infarction in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 913-916, 1985.

38. TERZI, C.; KUZU, A.; ASLAR, A. K.; KALE, I. T.; TANIK, A.; KOKSOY, C. Prevention of deleterious effects of reperfusion injury using one-week high-dose allopurinol. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 46, n. 2, p. 430-437, 2001.

39. TIXIER, E.; LALANNE, F.; JUST, I.; GALMICHE, J. P.; NEUNLIST, M. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1798-1810, 2005.

40. VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 71, n. p. 241-260, 2009.

41. WANG, Q.; PFEIFFER, G. R., 2ND; GAARDE, W. A. Activation of SRC tyrosine kinases in response to ICAM-1 ligation in pulmonary microvascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 48, p. 47731-47743, 2003.

42. WHITE, N. A.; MOORE, J. N.; TRIM, C. M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 193-198, 1980.
43. XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R. J.; GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, Washington, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.
44. YOO, J.; NICHOLS, A.; SONG, J. C.; MUN, E. C.; MATTHEWS, J. B. Protein kinase epsilon dampens the secretory response of model intestinal epithelia during ischemia. **Surgery**, Philadelphia, v. 130, n. 2, p. 310-318, 2001.
45. YOUNES, M.; SCHOENBERG, M. H.; JUNG, H.; FREDHOLM, B. B.; HAGLUND, U.; SCHILDBERG, F. W. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. **Research in Experimental Medicine**, New York, v. 184, n. 4, p. 259-264, 1984.
46. YOUNG, B. L.; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. L.; DABAREINER, R. M. Treatment of ischaemic jejunum with topical and intraluminal Carolina Rinse. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 34, n. 5, p. 469-474, 2002.
47. YUE, T. L.; WANG, C.; GU, J. L.; MA, X. L.; KUMAR, S.; LEE, J. C.; FEUERSTEIN, G. Z.; THOMAS, H.; MALEEFF, B.; OHLSTEIN, E. H. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. **Circulation Research**, Baltimore, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.
48. ZHENG, S. Y.; FU, X. B.; XU, J. G.; ZHAO, J. Y.; SUN, T. Z.; CHEN, W. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase may decrease intestinal epithelial cell apoptosis and improve intestinal epithelial barrier function after ischemia- reperfusion injury. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 5, p. 656-660, 2005.

CAPÍTULO 4– CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante os últimos anos houve inúmeras tentativas de reduzir os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão no intestino de equinos. Entretanto, situações clínicas de cólica envolvendo interrupção do fluxo sanguíneo ainda resultam em números drásticos de fatalidade, mesmo quando a intervenção cirúrgica, bem como, a aplicação de tratamentos modernos são empregados. Muitos estudos tem demonstrado os benefícios que podem representar algumas drogas nesses casos, mas nenhum tratamento isolado parece ser tão eficaz quanto necessário.

Há mais de 10 anos foi discutida a possibilidade do emprego da modulação da apoptose, de forma mais generalizada, como um princípio terapêutico para o futuro. Realmente, a identificação de genes e produtos gênicos que regulam a apoptose e outros modelos de morte celular, juntamente ao aprimoramento dos conhecimentos a respeito dos seus mecanismos de ação, têm funcionado como fundamentos na descoberta de novas drogas visando controlar os mecanismos de morte celular. Embora as intervenções anti-apoptóticas possam significar o objetivo futuro para a proteção intestinal, a regulação da apoptose intestinal é muito complexa e é controlada por vários fatores.

Os mecanismos envolvendo a transdução de sinal podem representar um caminho promissor para novos protocolos de tratamentos e melhor compreensão dos processos patológicos. Estudos que estabeleçam um paralelo entre os mecanismos envolvidos na ativação de ERK 1/2 e p38 e a atuação de complexos farmacológicos poderão estabelecer a viabilidade de se potencializar o efeito protetor de ERK, ou mesmo bloquear a ação de p38, como forma de minimizar os efeitos deletérios da I/R no intestino de equinos. Entretanto, apesar do papel essencialmente anti-apoptótico de ERK 1/2 e pró-apoptótico de p38, estudos começaram a apontar a possível participação de ERK 1/2 na indução da apoptose, em resposta ao estresse isquêmico e de p38 na proteção tecidual durante a isquemia. Essas definições evidenciam a necessidade da realização de mais pesquisas, já que os resultados das interferências sobre ambas as vias de transdução não estão completamente elucidados.

A utilização dos anticorpos primários monoclonais anti-phospho-p44/42 e anti-phospho-p38, na imunoistoquímica de fragmentos de jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão, demonstra a ativação de p38 e ERK 1/2 nos diferentes momentos e diferentes camadas do segmento em estudo. Entretanto, a solução de Carolina Rinse não atuou diretamente no perfil de ativação dessas enzimas e, neste caso, também não atenuou as lesões observadas nas diversas camadas do jejuno de coelhos. Apesar da possibilidade do tempo de contato do segmento intestinal com a solução de Carolina Rinse não ter sido adequado para a obtenção dos melhores resultados, a permanência do segmento imerso em CRS por longo período, poderia significar maior tempo de estresse cirúrgico. Essa observação é ainda mais relevante no contexto das situações não experimentais, o que pode representar o desenvolvimento de lesão adicional.

Os índices mais expressivos de ERK 1/2 e p38 fosforiladas foram observados nas camadas musculares lisas do intestino delgado. Apesar dos inúmeros estudos que descrevem as lesões observadas na mucosa intestinal após isquemia e reperfusão, pouco se sabe a respeito das reais consequências da I/R nas demais camadas do intestino delgado. No presente estudo, lesões significativas foram observadas nas camadas musculares e plexo mioentérico. Estudos já demonstraram a capacidade de reepitelização da mucosa intestinal. Contudo, os efeitos das lesões no plexo mioentérico e nas camadas musculares sobre a motilidade intestinal, a longo prazo em equinos submetidos à isquemia e reperfusão, poderiam estar relacionados aos graves problemas de disfunção motora intestinal observados na espécie após episódios de cólica envolvendo segmentos do intestino delgado. Portanto, o objetivo da tentativa de se minimizar os efeitos deletérios decorrentes da isquemia e reperfusão não pode estar restrito à mucosa intestinal.

A utilização de coelhos como modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal, visando elucidar os mecanismos envolvidos na obstrução estrangulante do intestino delgado de equinos e promover avanços terapêuticos para a espécie, parece ser uma alternativa acessível e viável. Entretanto, as lesões resultantes do período de uma hora de isquemia são mais acentuadas em coelhos que em equinos. A redução do tempo de isquemia experimental em coelhos poderá trazer mais informações a respeito das lesões e da ativação das

MAP quinases, nas diversas camadas do intestino delgado, observadas antes do estabelecimento da necrose.

A determinação e o conhecimento dos fatores envolvidos na ativação e inibição da morte celular, em todas as camadas do intestino, observados nas doenças obstrutivas do trato gastrointestinal dos equinos, favorecerão a descoberta de tratamentos mais eficazes, com o intuito de reduzir a morbidade e mortalidade observadas nesta espécie.

ANEXOS

QUADRO 1-Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas na base da mucosa do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
EDEMA	1	1.0/1.0	1.0/1.0	0.8/1.0
	2	1.6/2.0	1.6/2.2	1.0/1.0
	3	1.0/1.0	2.0/2.0	1.2/1.0
	4	0.8/1.0	1.8/2.0	1.4/1.0
	5	1.4/1.0	0.8/1.0	1.0/1.0
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	0.6/1.0	0.6/1.0	1.0/1.0
	2	0.6/1.0	0.8/1.0	0.8/1.0
	3	0.6/1.0	1.0/1.0	1.0/1.0
	4	1.2/1.0	1.8/2.0	1.4/1.0
	5	1.0/1.0	1.8/2.0	1.6/2.0
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	1.6/2.0	1.2/2.0	1.8/2.0
	2	1.6/2.0	2.0/2.0	2.0/3.0
	3	1.4/2.0	1.8/2.0	2.6/3.0
	4	1.4/1.0	2.4/3.0	2.6/3.0
	5	2.4/3.0	3.0/3.0	2.6/3.0
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	1.0/1.0	0.8/0.0
	4	0.0/0.0	2.0/2.0	2.8/3.0
	5	0.0/0.0	2.2/2.0	2.8/3.0
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	1.2/1.0	0.8/0.0
	4	0.0/0.0	2.2/2.0	2.6/3.0
	5	0.0/0.0	2.0/2.0	2.8/3.0
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	2.4/2.0	0.8/0.0
	4	0.6/0.0	0.8/0.0	0.0/0.0
	5	0.2/0.0	0.8/0.0	0.6/0.0
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	2.8/3.0	0.8/0.0
	4	0.2/0.0	1.0/0.0	0.0/0.0
	5	0.4/0.0	0.6/0.0	0.6/0.0

QUADRO 2- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas na base da mucosa do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
EDEMA	1	Kruskal Wallis	0.8432
	2	Kruskal Wallis	0.6056
	3	Kruskal Wallis	0.1437
	4	Kruskal Wallis	0.1173
	5	Kruskal Wallis	0.3905
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	0.5429
	2	Kruskal Wallis	0.7343
	3	Kruskal Wallis	0.1173
	4	Kruskal Wallis	0.5375
	5	Kruskal Wallis	0.1324
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	0.6484
	2	Kruskal Wallis	0.8525
	3	Kruskal Wallis	0.1139
	4	Kruskal Wallis	0.1593
	5	Kruskal Wallis	0.3604
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Kruskal Wallis	0.1470
	4	Student Newman-Keuls	0.0036
		A X B	0.0370
		A X C	0.0013
		B X C	0.2579
	5	Student Newman-Keuls	0.0047
		A X B	0.0237
		A X C	0.0024
		B X C	0.4367
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Kruskal Wallis	0.1343
	4	Student Newman-Keuls	0.0047
		A X B	0.0216
		A X C	0.0027
		B X C	0.4795
	5	Student Newman-Keuls	0.0024
		A X B	0.0047
		A X C	0.0133
		B X C	0.7237
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Student Newman-Keuls	0.0212
		A X B	0.0065
		A X C	0.3222
		B X C	0.0832
	4	Kruskal Wallis	0.6075
	5	Kruskal Wallis	0.8202
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Student Newman-Keuls	0.0150
		A X B	0.0052
		A X C	0.3580
		B X C	0.0610
	4	Kruskal Wallis	0.5234
	5	Kruskal Wallis	0.9069

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 3- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas nos enterócitos do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
NECROSE: ÁPICE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.2/0.0
	2	0.0/0.0	0.6/1.0	0.6/1.0
	3	0.0/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	4	0.2/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	5	0.4/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
NECROSE: ZONA INTERMEDIÁRIA	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.2/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.6/1.0
	3	0.0/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	4	0.2/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	5	0.4/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
NECROSE: BASE DAS VILOSIDADES	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.2/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.4/0.0
	3	0.0/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	4	0.2/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	5	0.2/0.0	3.0/3.0	3.0/3.0
INTEGRIDADE: BASE DAS VILOSIDADES	1	3.0/3.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	2	3.0/3.0	3.0/3.0	3.0/3.0
	3	3.0/3.0	0.4/0.0	0.4/0.0
	4	3.0/3.0	0.2/0.0	0.2/0.0
	5	3.0/3.0	0.0/0.0	0.2/0.0

QUADRO 4- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas nos enterócitos do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
NECROSE: ÁPICE	1	Kruskal Wallis	0.8539
	2	Kruskal Wallis	0.2289
	3	Student Newman-Keuls	0.0086
		A X B	0.0150
		A X C	0.0150
		B X C	- *
	4	Student Newman-Keuls	0.0117
		A X B	0.0187
		A X C	0.0187
		B X C	- *
	5	Student Newman-Keuls	0.0158
		A X B	0.0231
		A X C	0.0231
		B X C	- *
NECROSE: ZONA INTERMEDIÁRIA	1	Kruskal Wallis	0.8539
	2	Kruskal Wallis	0.3273
	3	Student Newman-Keuls	0.0013
		A X B	0.0080
		A X C	0.0080
		B X C	- *
	4	Student Newman-Keuls	0.0117
		A X B	0.0187
		A X C	0.0187
		B X C	- *
	5	Student Newman-Keuls	0.0158
		A X B	0.0231
		A X C	0.0231
		B X C	- *
NECROSE: BASE DAS VILOSIDADES	1	Kruskal Wallis	0.8539
	2	Kruskal Wallis	0.6215
	3	Student Newman-Keuls	0.0086
		A X B	0.0150
		A X C	0.0150
		B X C	- *
	4	Student Newman-Keuls	0.0117
		A X B	0.0187
		A X C	0.0187
		B X C	- *
	5	Student Newman-Keuls	0.0117
		A X B	0.0187
		A X C	0.0187
		B X C	- *
INTEGRIDADE: BASE DAS VILOSIDADES	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Student Newman-Keuls	0.0254
		A X B	0.0150
		A X C	0.0285
		B X C	0.8077
	4	Student Newman-Keuls	0.0230
		A X B	0.0187
		A X C	0.0187
		B X C	- *
	5	Kruskal Wallis	0.0191
		A X B	0.0102
		A X C	0.0266
		B X C	0.7252

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 5- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas na lâmina própria do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
HEMORRAGIA	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	1.8/2.0	0.4/0.0
	4	0.0/0.0	2.6/3.0	1.8/2.0
	5	0.0/0.0	2.6/3.0	2.2/2.0
EDEMA	1	1.0/1.0	0.8/1.0	0.4/0.0
	2	1.2/1.0	1.2/1.0	0.8/1.0
	3	0.8/1.0	0.6/0.0	0.0/0.0
	4	0.6/1.0	0.4/0.0	0.4/0.0
	5	1.4/1.0	0.2/0.0	0.0/0.0

QUADRO 6- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas na lâmina própria do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
HEMORRAGIA	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.2890
	3	Kruskal Wallis	0.0599
	4	Student Newman-Keuls	0.0046
		A X B	0.0017
		A X C	0.0310
		B X C	0.3222
	5	Student Newman-Keuls	0.0047
		A X B	0.0027
		A X C	0.0216
		B X C	0.4795
EDEMA	1	Kruskal Wallis	0.2910
	2	Kruskal Wallis	0.6653
	3	Kruskal Wallis	0.2755
	4	Kruskal Wallis	0.7251
	5	Student Newman-Keuls	0.0131
		A X B	0.0237
		A X C	0.0065
		B X C	0.6458

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 7- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas nas criptas de Lieberkuhn do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
NECROSE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	1.6/2.0	0.6/1.0
	4	0.0/0.0	2.0/2.0	1.4/1.0
	5	0.0/0.0	2.4/2.0	1.8/2.0

QUADRO 8- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas nas criptas de Lieberkuhn do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
NECROSE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Student Newman-Keuls	0.0097
		A X B	0.0030
		A X C	0.2031
		B X C	0.0897
	4	Student Newman-Keuls	0.0028
		A X B	0.0015
		A X C	0.0339
		B X C	0.2888
	5	Student Newman-Keuls	0.0054
		A X B	0.0024
		A X C	0.0237
		B X C	0.4367

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 9- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas na submucosa do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
EDEMA	1	0.8/1.0	1.0/1.0	0.6/1.0
	2	1.8/2.0	1.6/2.0	1.2/1.0
	3	1.2/1.0	2.0/2.0	2.2/2.0
	4	1.4/2.0	2.0/2.0	2.2/2.0
	5	1.4/1.0	2.2/2.0	2.6/3.0
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	0.2/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.8/1.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	4	1.0/1.0	1.8/2.0	1.8/2.0
	5	1.8/2.0	2.4/3.0	1.8/2.0
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	0.2/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.6/0.0	0.0/0.0
	3	1.0/1.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	4	1.8/2.0	2.8/3.0	1.8/2.0
	5	2.4/3.0	2.8/3.0	2.8/3.0
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.0/0.0	0.2/0.0
	4	0.0/0.0	0.8/0.0	2.0/2.0
	5	0.0/0.0	0.8/1.0	2.4/2.0
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.4/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.0/0.0	0.4/0.0
	4	0.0/0.0	1.2/1.0	2.2/2.0
	5	0.0/0.0	2.0/2.0	2.6/3.0
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.4/0.0	0.0/0.0
	2	0.2/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	1.6/2.0	1.2/1.0
	4	0.4/0.0	1.0/0.0	1.4/2.0
	5	0.6/0.0	1.6/1.0	2.2/2.0
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	2	0.2/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	2.0/2.0	1.6/2.0
	4	0.4/0.0	1.0/0.0	1.2/1.0
	5	1.0/0.0	1.4/1.0	2.0/2.0

QUADRO 10- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas na submucosa do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
EDEMA	1	Kruskal Wallis	0.5732
	2	Kruskal Wallis	0.4907
	3	Kruskal Wallis	0.1051
	4	Kruskal Wallis	0.2795
	5	Kruskal Wallis	0.0545
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	0.8290
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.1844
	4	Kruskal Wallis	0.3370
	5	Kruskal Wallis	0.4611
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	0.8290
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.1844
	4	Kruskal Wallis	0.1778
	5	Kruskal Wallis	0.9847
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.8290
	4	Student Newman-Keuls	0.0119
		A X B	0.1908
		A X C	0.0033
		B X C	0.1039
	5	Student Newman-Keuls	0.0029
		A X B	0.1573
		A X C	0.0008
		B X C	0.0518
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.8290
	4	Student Newman-Keuls	0.0209
		A X B	0.1284
		A X C	0.0065
		B X C	0.2293
	5	Student Newman-Keuls	0.0143
		A X B	0.0403
		A X C	0.0065
		B X C	0.5017
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	0.8290
	2	Kruskal Wallis	0.8288
	3	Student Newman-Keuls	0.0143
		A X B	0.0065
		A X C	0.0403
		B X C	0.5017
	4	Kruskal Wallis	0.5166
	5	Kruskal Wallis	0.0981
MARGINAÇÃO LEUCOCITÁRIA: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	0.8290
	2	Kruskal Wallis	0.8288
	3	Student Newman-Keuls	0.0126
		A X B	0.0080
		A X C	0.0339
		B X C	0.5959
	4	Kruskal Wallis	0.5785
	5	Kruskal Wallis	0.3991

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 11- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas na camada muscular interna do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
EDEMA	1	1.0/1.0	0.6/1.0	0.8/1.0
	2	0.8/1.0	0.8/0.0	1.0/1.0
	3	0.8/1.0	1.2/1.0	1.0/1.0
	4	1.0/1.0	1.6/1.0	2.2/2.0
	5	1.4/1.0	2.2/2.0	2.6/3.0
NECROSE	1	0.4/0.0	0.2/0.0	0.4/0.0
	2	0.2/0.0	0.8/0.0	0.8/1.0
	3	0.0/0.0	1.4/1.0	1.0/1.0
	4	0.4/0.0	1.6/1.0	2.2/2.0
	5	0.4/0.0	2.0/2.0	2.2/2.0
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.6/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.8/0.0	1.4/1.0
	5	0.0/0.0	0.8/0.0	2.0/2.0
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.6/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.4/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.8/0.0	1.4/2.0
	5	0.0/0.0	0.8/0.0	1.6/2.0
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.4/0.0	0.4/0.0
	5	0.8/0.0	1.4/2.0	0.8/0.0
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.4/0.0	0.4/0.0
	5	1.0/0.0	1.4/2.0	0.8/0.0

QUADRO 12- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas na camada muscular interna do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
EDEMA	1	Kruskal Wallis	0.3168
	2	Kruskal Wallis	0.7773
	3	Kruskal Wallis	0.6298
	4	Kruskal Wallis	0.1150
	5	Student Newman-Keuls	0.0243
		A X B	0.1116
		A X C	0.0147
		B X C	0.3961
NECROSE	1	Kruskal Wallis	0.8233
	2	Kruskal Wallis	0.8233
	3	Student Newman-Keuls	0.0030
		A X B	0.0027
		A X C	0.0216
		B X C	0.4795
	4	Student Newman-Keuls	0.0188
		A X B	0.0714
		A X C	0.0080
		B X C	0.3961
	5	Student Newman-Keuls	0.0140
		A X B	0.0216
		A X C	0.0099
		B X C	0.7773
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.8290
	4	Kruskal Wallis	0.2550
	5	Kruskal Wallis	0.0879
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.0829
	4	Kruskal Wallis	0.2410
	5	Kruskal Wallis	0.0907
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Kruskal Wallis	- *
	4	Kruskal Wallis	0.6075
	5	Kruskal Wallis	0.7612
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Kruskal Wallis	- *
	4	Kruskal Wallis	0.6075
	5	Kruskal Wallis	0.8184

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 13- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas no plexo mioentérico do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
EDEMA	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.2/0.0
	3	0.0/0.0	0.2/0.0	0.2/0.0
	4	0.4/0.0	1.6/1.0	1.2/1.0
	5	0.6/1.0	1.4/1.0	2.0/2.0
NECROSE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	1.2/1.0	1.2/1.0
	4	0.0/0.0	2.0/2.0	2.0/2.0
	5	0.0/0.0	2.6/3.0	2.8/3.0

QUADRO 14- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas no plexo mioentérico do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
EDEMA	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8288
	3	Kruskal Wallis	0.2255
	4	Student Newman-Keuls	0.0385
		A X B	0.0310
		A X C	0.0966
		B X C	0.6206
	5	Student Newman-Keuls	0.0470
		A X B	0.1376
		A X C	0.0259
		B X C	0.4578
NECROSE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Student Newman-Keuls	0.0040
		A X B	0.0080
		A X C	0.0080
		B X C	- *
	4	Student Newman-Keuls	0.0079
		A X B	0.0080
		A X C	0.0080
		B X C	- *
	5	Student Newman-Keuls	0.0049
		A X B	0.0133
		A X C	0.0047
		B X C	0.7237

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 15- Valores de média e mediana da avaliação em escores das alterações observadas na camada muscular externa do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	GRUPOS		
		A	B	C
EDEMA	1	0.4/0.0	0.6/1.0	0.4/0.0
	2	0.4/0.0	1.0/1.0	0.6/1.0
	3	1.0/1.0	1.4/1.0	1.8/2.0
	4	0.6/1.0	1.6/2.0	1.8/2.0
	5	1.0/1.0	2.6/3.0	2.4/2.0
NECROSE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.8/1.0	0.2/0.0
	3	0.2/0.0	1.2/2.0	1.8/2.0
	4	0.0/0.0	1.6/2.0	1.4/1.0
	5	0.2/0.0	2.0/2.0	2.4/2.0
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.2/1.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.6/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.8/0.0	1.4/2.0
	5	0.0/0.0	1.4/1.0	2.0/2.0
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.6/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.4/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.8/0.0	2.0/2.0
	5	0.0/0.0	1.2/2.0	1.6/2.0
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	5	0.2/0.0	0.8/0.0	0.8/0.0
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	2	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	3	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	4	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0/0.0
	5	0.6/0.0	1.0/0.0	0.4/0.0

QUADRO 16- Comparação entre grupos, nos diferentes tempos, da avaliação em escores das alterações observadas na camada muscular externa do jejuno de coelhos submetidos à isquemia e reperfusão.

VARIÁVEL	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
EDEMA	1	Kruskal Wallis	0.8119
	2	Kruskal Wallis	0.5691
	3	Kruskal Wallis	0.1405
	4	Student Newman-Keuls	0.0205
		A X B	0.0518
		A X C	0.0162
		B X C	0.6458
	5	Student Newman-Keuls	0.0132
		A X B	0.0099
		A X C	0.0284
		B X C	0.6973
NECROSE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.2466
	3	Student Newman-Keuls	0.0372
		A X B	0.1284
		A X C	0.0162
		B X C	0.3768
	4	Student Newman-Keuls	0.0060
		A X B	0.0047
		A X C	0.0133
		B X C	0.7237
	5	Student Newman-Keuls	0.0065
		A X B	0.0216
		A X C	0.0037
		B X C	0.5478
HEMORRAGIA: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.8290
	4	Kruskal Wallis	0.1111
	5	Student Newman-Keuls	0.0319
		A X B	0.0897
		A X C	0.0109
HEMORRAGIA: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	0.8290
	3	Kruskal Wallis	0.8290
	4	Kruskal Wallis	0.0712
	5	Kruskal Wallis	0.0666
INFILTRADO PMN: INTENSIDADE	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Kruskal Wallis	- *
	4	Kruskal Wallis	- *
	5	Kruskal Wallis	0.7615
INFILTRADO PMN: DISTRIBUIÇÃO	1	Kruskal Wallis	- *
	2	Kruskal Wallis	- *
	3	Kruskal Wallis	- *
	4	Kruskal Wallis	- *
	5	Kruskal Wallis	0.8202

* O valor de p não foi determinado porque os valores das variáveis são iguais

QUADRO 17- Comparação entre grupos da marcação pelo anticorpo monoclonal anti-phospho-p38 nas diferentes camadas do jejuno de coelhos.

CAMADA	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS A, B e C	VALOR DE p
LÂMINA PRÓPRIA	1	Kruskal Wallis	0.7558
	2	Kruskal Wallis	0.6126
	3	Kruskal Wallis	0.9608
	4	Kruskal Wallis	0.4677
	5	Kruskal Wallis	0.8270
CRIPTAS DE LIEBERKUHN	1	Kruskal Wallis	0.1637
	2	Kruskal Wallis	0.8106
	3	Kruskal Wallis	0.5434
	4	Kruskal Wallis	0.9608
	5	Kruskal Wallis	0.6977
MUSCULAR INTERNA	1	Kruskal Wallis	0.3296
	2	Kruskal Wallis	0.1809
	3	Student Newman-Keuls	0.0068
		A X B	0.0024
		A X C	0.0237
		B X C	0.4367
	4	Student Newman-Keuls	0.0087
		A X B	0.0133
		A X C	0.0047
		B X C	0.7237
	5	Kruskal Wallis	0.0545
PLEXO MIOENTÉRICO	1	Kruskal Wallis	0.6188
	2	Kruskal Wallis	0.6505
	3	Kruskal Wallis	0.0665
	4	Kruskal Wallis	0.0846
	5	Kruskal Wallis	0.1023
MUSCULAR EXTERNA	1	Kruskal Wallis	0.0750
	2	Kruskal Wallis	0.1738
	3	Student Newman-Keuls	0.0178
		A X B	0.0047
		A X C	0.1039
		B X C	0.2293
	4	Student Newman-Keuls	0.0081
		A X B	0.0162
		A X C	0.0037
		B X C	0.6206
	5	Student Newman-Keuls	0.0365
		A X B	0.0284
		A X C	0.0237
		B X C	0.9436

QUADRO 18- Comparação entre grupos da marcação pelo anticorpo monoclonal anti-phospho-p44/42 nas diferentes camadas do jejuno de coelhos.

CAMADA	TEMPOS	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	VALOR DE p
LÂMINA PRÓPRIA	1	Kruskal Wallis	0.8781
	2	Kruskal Wallis	0.8270
	3	Kruskal Wallis	0.1604
	4	Kruskal Wallis	0.1845
	5	Kruskal Wallis	0.1451
CRIPTAS DE LIEBERKUHN	1	Kruskal Wallis	0.1637
	2	Kruskal Wallis	0.2753
	3	Student Newman-Keuls	0.0098
		A X B	0.0024
		A X C	0.1573
		B X C	0.1039
	4	Student Newman-Keuls	0.0140
		A X B	0.0037
		A X C	0.0771
		B X C	0.2579
	5	Kruskal Wallis	0.2808
MUSCULAR INTERNA	1	Student Newman-Keuls	0.0455
		A X B	0.6714
		A X C	0.0196
		B X C	0.0562
	2	Student Newman-Keuls	0.5434
	3	Student Newman-Keuls	0.0365
		A X B	0.0284
		A X C	0.0237
		B X C	0.9436
	4	Student Newman-Keuls	0.0090
		A X B	0.0109
		A X C	0.0058
		B X C	0.8320
	5	Student Newman-Keuls	0.0167
		A X B	0.0072
		A X C	0.0284
		B X C	0.6206
PLEXO MIOENTÉRICO	1	Kruskal Wallis	0.7334
	2	Kruskal Wallis	0.9608
	3	Kruskal Wallis	0.5326
	4	Kruskal Wallis	0.4449
	5	Kruskal Wallis	0.1629
MUSCULAR EXTERNA	1	Kruskal Wallis	0.2276
	2	Kruskal Wallis	0.0773
	3	Kruskal Wallis	0.1959
	4	Student Newman-Keuls	0.0092
		A X B	0.0072
		A X C	0.0089
		B X C	0.9436
	5	Kruskal Wallis	0.1959