JORGE JOSÉ RIO TINTO DE MATOS

**Tratamento com glutamina ou associação de hidrocortisona,
dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina de lesões
decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no
cólon maior de equinos**

São Paulo

2011

JORGE JOSÉ RIO TINTO DE MATOS

**Tratamento com glutamina ou associação de hidrocortisona,
dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina de lesões
decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no
cólon maior de equinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2487
FMVZ

Rio Tinto, Jorge José de Matos

Tratamento com glutamina ou associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon ascendente de equinos / Jorge José Rio Tinto de Matos. -- 2011.

115 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva.

1. Intestino. Gastroenterologia. Cirurgia. Microscopia eletrônica. Mieloperoxidase

.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Jorge José Rio Tinto de Matos

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto protocolado sob o número 2104/2010, intitulado: "Tratamento das lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon de equinos com glutamina ou associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina", no qual foram utilizados 19 (dezenove) equinos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética adotados por esta Comissão e aprovou "ad referendum".

São Paulo, 30 de junho de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Rio Tinto, Jorge José de Matos

Título: **Tratamento com glutamina ou associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon maior de equinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais,

José Carlos, Maria do Carmo e Ana Augusta

AGRADECIMENTOS

À minha querida esposa, Adriana Junho Brasil Rio Tinto de Matos, por seu apoio e seu amor incondicional, pelas horas subtraídas de convivência e pela ajuda quando mais foi necessário. Além disso, obrigado por ter me dado um filho maravilhoso e mais um motivo para que eu queira conduzir minha vida tentando fazer sempre o melhor.

Ao meu orientador, Dr Luís Cláudio Lopes Correia da Silva, pela orientação sempre firme e serena; e, acima de tudo, pela amizade, exemplo de profissional e ser humano.

Aos Professores Cyril Alexandre de Marval e Eutálio Pimenta pela amizade e companheirismo, pelas gargalhadas e o auxílio nos momentos fundamentais.

Aos agora já colegas Rafael Alface, Vivi, Joãozinho e Aline Morena pela amizade, lealdade e a incansável disposição em ajudar na fase experimental.

Ao Osnei, José Rodrigues e Fernando, enfermeiros do setor de Grandes Animais da PUC Minas Betim pela lealdade e o apoio e esforço muito além da obrigação.

À Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais que apoiou este projeto, disponibilizando instalações e recursos para sua execução.

Aos colegas e funcionários do Hospital Veterinário da PUC Minas Betim, pelo imprescindível auxílio durante a fase experimental, sem o qual teria sido impossível realizar este trabalho.

Ao professor Martinho do Departamento de Odontologia da PUC Minas, pelo apoio e disponibilidade na realização das fotos.

Aos professores Geraldo Eleno Siveira Alves e Rafael Faleiros, pela amizade e pela colaboração no delineamento do projeto e análise estatística.

À Professora Geane Maciel Pagliosa pelo seu indispensável auxílio durante a fase experimental, por sua amizade e seu jeito manso de ser.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Prof. Mauro Teixeira do laboratório de Imunofarmacologia do ICB por disponibilizar sua utilização. Aos bolsistas Heloísa Maria Falcão Mendes e Tiago Alves pela contribuição na avaliação das análises laboratoriais.

À Cristália, Bravet e Fort Dodge, que contribuíram doando produtos para a utilização na fase experimental.

À Fapemig que financiou parte dos recursos utilizados neste trabalho.

RESUMO

RIO TINTO, J. J. M. **Tratamento com glutamina ou associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon maior de equinos.** [Treatment with glutamine or association of hydrocortisone, dimethyl sulphoxide, ascorbic acid and pentoxifylline of experimentaly induced ischemia reperfusion lesions in the equine large colon]. 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

Com o objetivo de estudar os possíveis efeitos da administração sistêmica de glutamina ou da associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina nas lesões de isquemia e reperfusão no cólon maior, foram utilizados dezoito equinos. Sob anestesia geral e controle da oximetria de pulso e pressão arterial, os equinos foram submetidos a laparotomia e em um segmento do cólon maior foi induzida isquemia venosa total. Após uma hora de isquemia, seis equinos do Grupo G receberam glutamina (25mg/Kg IV), seis equinos do Grupo A receberam uma associação de hidrocortisona (4mg/Kg IV), dimetilsulfóxido (20mg/Kg IV), ácido ascórbico (50mg/Kg IV), e pentoxifilina (10mg/Kg IV) e os seis equinos do Grupo C receberam apenas solução de Ringer com lactato e constituíram o Grupo controle. Após duas horas de isquemia o fluxo sanguíneo local foi restabelecido. Decorridas duas horas de reperfusão foi realizada a laparorrafia e permitiu-se a recuperação anestésica. Seis horas após o início da reperfusão os equinos do Grupo G receberam novamente 25mg/Kg de glutamina, enquanto os equinos dos Grupos A e C receberam apenas solução de Ringer com lactato. Doze horas após o início da reperfusão os equinos foram eutanasiados. Foram colhidas amostras de cólon antes da indução da isquemia, após duas horas de isquemia e após duas e doze horas de reperfusão, que foram submetidas a avaliação histomorfológica, ultra-estrutural e determinação da atividade de mieloperoxidase. Os resultados para todas as variáveis estudadas foram semelhantes entre os grupos, permitindo concluir que os tratamentos, nas condições em que foram empregados neste estudo, não foram eficazes em atenuar as alterações decorrentes de isquemia e reperfusão no cólon maior de equinos.

Palavras-chave: Intestino. Gastroenterologia. Cirurgia. Microscopia eletrônica. Mieloperoxidase.

ABSTRACT

RIO TINTO, J. J. M. **Treatment with glutamine or association of hydrocortisone, dimethyl sulphoxide, ascorbic acid and pentoxifylline of experimentally induced ischemia reperfusion lesions in the equine large colon.** [Tratamento com glutamina ou associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon maior de equinos]. 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011

This study was designed to evaluate the effects of intravenous administration of glutamine or the association of hydrocortisone, dimethyl sulphoxide, ascorbic acid and pentoxifylline on ischemia reperfusion lesions of the large colon. A segment of the large colon was isolated in 18 horses under inhalant general anesthesia and total venous ischemia was induced. One hour after the onset of ischemia, glutamine (25mg/Kg IV) was administered to six horses (G group), an association of hydrocortisone (4mg/Kg IV), dimethyl sulphoxide (20mg/Kg IV), ascorbic acid (50mg/Kg IV) and pentoxifylline (10mg/Kg IV) was administered to six horses, and the others received only isotonic fluids and remained as the control group (C). After 2 hours of ischemia and 2 hours of reperfusion the abdomen was closed and the horses were allowed to recover from anesthesia. After 6 hours of reperfusion, horses of group G received another dose of glutamine (25mg/Kg IV) whereas groups A and C received only isotonic fluids. Horses were euthanatized 12 hours after reperfusion. Biopsies were taken from the large colon before and after 2 hours of ischemia and after 2 and 12 hours of reperfusion. Alterations were evaluated under light and scanning electronic microscopy and scored. Additionally, mieloperoxidase (MPO) activity was measured. Results showed that scores for mucosal lesion, edema, hemorrhage, neutrophil infiltration and MPO activity during IR were similar between groups G, A and C. It was concluded that treatments were not effective in attenuating effects of ischemia and reperfusion in the equine large colon.

Keywords: Intestine. Gastroenterology. Surgery. Electronic microscopy. Mieloperoxidase.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Tratamentos realizados nos equinos dos grupos experimentais – Betim – 2006/2007	49
Quadro 2 -	Caracterização e localização de colheitas de amostras dos grupos experimentais– Betim – 2006/2007	51
Quadro 3 -	Caracterização dos escores para lesão na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, modificado de FALEIROS (2003)	52
Quadro 4 -	Caracterização dos escores para presença de neutrófilos no cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, modificado de FALEIROS (2003)	53
Quadro 5 -	Caracterização dos escores para edema e hemorragia no cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, modificado de FALEIROS (2003)	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cólon maior do eqüino experimental nº 19 após duas horas de isquemia. Observa-se o manguito inflado e o posicionamento do sensor de temperatura (seta) – Betim – 2006/2007	47
Figura 2 -	Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE, mostrando a caracterização dos escores para lesão na mucosa (A, B, C, D e E Ob. 10x). A) escore 0 (ausente). As células do epitélio e das glândulas se encontram bem aderidas à lâmina própria. B) escore 1 (discreto). Presença de vacúolos intracitoplasmáticos e de espaços entre as células do epitélio (setas). C) escore 2 (leve). A camada de células do epitélio luminal se encontra rompida (seta). D) escore 3 (intermediário). Desprendimento do epitélio luminal com exposição da lâmina própria (setas). E) escore 4 (moderado) Desprendimento de aproximadamente 50% do epitélio das criptas e início de necrose da lâmina própria– Betim – 2006/2007	54
Figura 3 -	Cólon maior do eqüino experimental nº 17 após duas horas de isquemia. A) Espessamento do intestino e do mesocólon. B) Edema do mesocólon e ingurgitamento dos vasos murais – Betim – 2006/2007	60
Figura 4 -	Cólon maior do eqüino experimental nº 19 após duas horas de isquemia e duas horas de reperfusão. A) intenso edema na submucosa B) detalhe da amostra evidenciando hiperemia da mucosa e serosa e intenso edema da submucosa – Betim – 2006/2007	60
Figura 5 -	Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE, evidenciando o padrão de hemorragia na mucosa e na submucosa durante as fases de isquemia e de reperfusão (A, B e C Ob. 4x). A) após duas horas de isquemia (equino nº 10). Hemorragia extensa nas camadas mucosa (setas menores) e submucosa (setas maiores), correspondendo em ambas ao escore 3. B) após duas horas de reperfusão (eqüino nº 18). Presença de hemorragia severa na mucosa e submucosa, correspondendo ao escore 4 em ambas as camadas. C) Após doze horas de reperfusão (eqüino nº 16). Hemorragia extensa na mucosa (setas menores) correspondendo ao escore 3, e facilmente observada na submucosa (setas maiores), correspondendo ao escore 2– Betim – 2006/2007	66
Figura 6 -	Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE., evidenciando o edema na submucosa (A e B Ob. 4x). A) pré-isquemia (equino nº 9). Ausência de edema na submucosa (seta) correspondendo ao escore 0 (ausente). B) após duas horas de reperfusão (eqüino nº 15). Congestão de vasos da submucosa (setas menores) e presença de severo edema na submucosa (seta maior), correspondendo ao escore 4 – Betim – 2006/2007	68
Figura 7 -	Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE, evidenciando a presença de neutrófilos e eosinófilos na submucosa durante a reperfusão. A) após duas horas de reperfusão (Ob 100x, equino nº 6). Marginação de neutrófilos em vasos da submucosa (setas), correspondendo ao escore 1, e presença de eosinófilos no tecido (setas menores) B) após doze horas de reperfusão (Ob 40x, eqüino nº 16). Ausência de neutrófilos extravasculares e em vaso da submucosa (seta), correspondendo ao escore 0 – Betim – 2006/2007	70

- Figura 8 - Características da mucosa normal do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x). Amostras pré-isquemia (T0). A (eqüino nº 5) e B (eqüino nº 4) – Observa-se aspecto enrugado da mucosa (setas menores) e abertura das criptas de fácil identificação (setas maiores) – Betim – 2006/2007 73
- Figura 9 – Características da mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x). A) Após duas horas de isquemia, a mucosa apresenta aspecto liso difuso e áreas de descontinuidade no epitélio (setas) (eqüino nº15). B) Após duas horas de reperfusão observam-se áreas maiores de descontinuidade no epitélio (setas maiores) e extensa área de exposição profunda da lâmina própria (setas menores) (eqüino nº13) – Betim – 2006/2007 74
- Figura 10 - Características da mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x), após doze horas de reperfusão. A) A cobertura epitelial encontra-se reparada, porém a mucosa apresenta fissuras profundas (setas) (eqüino nº1). B) No cólon à distância, a mucosa exibe aspecto “edemaciado” difuso, dificultando a identificação da abertura das criptas (setas) (eqüino nº17) – Betim – 2006/2007 75
- Figura 11 - Características da mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x). A) após duas horas de isquemia (eqüino nº14) e B) após duas horas de reperfusão à distância (eqüino nº11). Presença de muco sobre grande parte da mucosa (setas), impedindo sua visualização – Betim – 2006/2007 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos equinos utilizados no experimento e sua distribuição nos grupos experimentais – Betim – 2006/2007	45
Tabela 2 -	Escores médios e desvios padrão para presença de lesão na mucosa do cólon maior dos equinos dos grupos experimentais – Betim – 2006/2007	6
Tabela 3 -	Escores médios e desvios padrão para presença de neutrófilos, de hemorragia e de edema no cólon maior dos equinos dos grupos experimentais – Betim – 2006/2007	65
Tabela 4 -	Escores médios e desvios padrão para atividade de mieloperoxidase no cólon maior dos equinos dos grupos experimentais nos diferentes momentos – Betim – 2006/2007	77

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de lesão na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 62
- Gráfico 2 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de hemorragia na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 64
- Gráfico 3 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de hemorragia na submucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 66
- Gráfico 4 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de hemorragia na muscular do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 67
- Gráfico 5 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de edema na submucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 68

- Gráfico 6 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de neutrófilos na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 69
- Gráfico 7 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de neutrófilos na submucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 70
- Gráfico 8 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de neutrófilos na muscular do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 71
- Gráfico 9 - Médias e erros padrão da média dos escores para a atividade de mieloperoxidase no cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Grupo associação
ATP – adenosina trifosfato
COX-1 – cicloxigenase 1
COX-2 – cicloxigenase 2
C – Grupo controle
DAB – diaminobenzidina
DieC – dienes conjugados
EGG – éter gliceril guaiacol
G – Grupo glutamina
h - hora
HE – hematoxilina e eosina
I2 - após duas horas de isquemia no segmento experimental
IBF – isquemia de baixo fluxo
IM - intramuscular
IR – isquemia e reperfusão
ISQ-AV – isquemia total artériovenosa
ISQ-V – isquemia total venosa
IV – intravenosa
MDA – malondialdeído
MEV – microscopia eletrônica de varredura
mg/kg – miligrama por quilo
mmHg – milímetros de mercúrio
MPO – mieloperoxidase
NADPH-oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NO - óxido nítrico
R2 – após duas horas de reperfusão no segmento experimental
R12 - após doze horas de reperfusão no segmento experimental
R12 dist – após doze horas de reperfusão à distância do segmento experimental
RLOs – radicais livres derivados do oxigênio
T0 – antes do início da isquemia
UI/Kg – unidades internacionais por quilo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
3 OBJETIVOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5 RESULTADOS	58
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterologia é uma das áreas de maior importância na espécie eqüina, uma vez que o abdome agudo constitui a segunda emergência mais comum e a segunda maior causa de óbito não natural entre os equinos. Os distúrbios relacionados ao abdome agudo causam prejuízos significativos para os criadores, devido ao elevado custo do tratamento e às altas taxas de mortalidade (TRAUB-DARGATZ et al., 2001).

O abdome agudo pode ser causado de várias formas, sendo as obstruções intestinais responsáveis por 57% de sua ocorrência. Essas podem ser simples, quando não há acometimento circulatório e sim a interrupção no trânsito luminal, ou estrangulantes, que são mais graves por serem acompanhadas de isquemia e comprometimento da circulação loco-regional, podendo levar à necrose do intestino por isquemia (WHITE, 1999).

As lesões intestinais acompanhadas de isquemia e reperfusão são de grande importância, pela diversidade de sua etiologia, complexidade de sua fisiopatologia, por suas seqüelas e complicações, bem como pelo comprometimento sistêmico e por frequentemente necessitarem de intervenção cirúrgica para seu tratamento (BLIKSLAGER, 2006). Além disso, os casos de abdome agudo em que ocorre isquemia intestinal são particularmente importantes devido à alta mortalidade (WHITE, 1990).

Segundo White (1999), isquemia é a diminuição da perfusão dos tecidos que pode provocar hipóxia e alterações no metabolismo celular normal, causando rapidamente a morte celular, principalmente em tecidos com maior taxa metabólica, como o epitélio. Esta lesão provoca nas primeiras horas uma rápida e progressiva perda de células epiteliais, com exposição da lamina própria (SULLINS et al., 1985), atrofia das vilosidades e vacuolização das células (WHITE, 1999), e perda de fluido, eletrólitos, proteína e sangue para o lume intestinal ou para a cavidade peritoneal (RUGGLES et al., 1993).

Paradoxalmente, caso ocorra a correção da causa da isquemia, o retorno da perfusão local frequentemente leva ao agravamento das lesões iniciadas durante a

isquemia, em um fenômeno conhecido por injúria de reperfusão, chegando alguns autores a considerar que as lesões observadas durante a reperfusão podem ser ainda mais graves que as lesões causadas pela isquemia (FORSYTH; GUILFORD, 1995).

Acredita-se que a injúria de reperfusão ocorra, em sua maior parte, devido a produção de radicais livres de oxigênio, derivados de neutrófilos e da hipoxantina, com envolvimento de proteases, cálcio e mediadores lipídicos como os derivados do ácido araquidônico. O resultado é uma série de peroxidações lipídicas em cascata e quimiotaxia de neutrófilos, que acentuam as lesões celulares (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988), alterando o metabolismo de lipídeos, proteínas, carboidratos e do ácido desoxirribonucleico (FORSYTH; GUILFORD, 1995). Além dos radicais livres de oxigênio, outros fatores parecem contribuir para a injúria de reperfusão. O fator ativador de plaquetas, os eicosanóides, as endotoxinas e as bactérias podem promover o agravamento das lesões durante a reperfusão no intestino (FORSYTH; GUILFORD, 1995).

Atualmente, os tratamentos preconizados para isquemia e reperfusão intestinal baseiam-se em estudos experimentais realizados em animais de laboratório. Nesses animais a fisiopatologia da injúria de reperfusão está associada principalmente à produção de radicais livres de oxigênio, que ocorre com o retorno do fluxo sanguíneo (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988). No entanto, em equinos esse mecanismo ainda não está bem esclarecido, principalmente no intestino grosso, onde ainda não foram identificadas concentrações relevantes desses radicais e onde também não foi verificada ação protetora de substâncias que normalmente inibem a ação dos referidos radicais livres (BLIKSLAGER, 2006).

Por outro lado, após três décadas de estudos acerca dos efeitos da terapêutica das lesões decorrentes de isquemia e reperfusão no jejuno, alguns pesquisadores têm obtido resultados promissores empregando associações de substâncias com efeitos antiinflamatório, antioxidante e vasodilatador, dentre outros (MOORE et al., 1980; VAN HOOOGMOED et al., 2001b; VAN HOOOGMOED et al., 2002; ALVES et al., 2003; DABARAINER et al., 2005).

O presente estudo constitui a continuidade da pesquisa que foi objeto da dissertação de mestrado intitulada *Lesões de isquemia e reperfusão experimentais*

no jejuno de equinos: tratamento com succinato sódico de hidrocortisona (RIO TINTO, 1999), desenvolvida na Escola de Veterinária da UFMG. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a eficácia da hidrocortisona em atenuar as lesões de isquemia e reperfusão no jejuno (ALVES et al., 2003), constituindo, a nível mundial, o primeiro protocolo de uso parenteral para o tratamento das lesões de isquemia e reperfusão intestinal com possibilidade imediata de aplicação na rotina clínico-cirúrgica de pacientes equinos acometidos de abdome agudo.

Esses resultados, associados aqueles obtidos recentemente por outros pesquisadores, motivaram o interesse em pesquisar a associação entre a hidrocortisona, tratamento testado em nossa pesquisa anterior (RIO TINTO, 1999), e outros fármacos prontamente disponíveis no mercado nacional, para os quais já foi demonstrado potencial eficácia em atenuar as lesões de isquemia e reperfusão no intestino ou em outros tecidos, como o dimetilsulfóxido (DABARAINER et al., 2005), o ácido ascórbico (KEARNS, 1999), e a pentoxifilina (SIRIN et al., 1998; ABREU, 2003), ou em acelerar a reparação intestinal como a glutamina (MAZZAFERRO et al., 1998).

A associação de hidrocortisona, ácido ascórbico, dimetilsulfóxido e pentoxifilina tem sido empregada empiricamente na rotina do Hospital Veterinário da PUC Minas – Betim como coadjuvante do tratamento cirúrgico de equinos acometidos de abdome agudo, motivando que essa associação seja testada em condições controladas para testar sua eficácia e permitir o estabelecimento de um protocolo padronizado e factível de aplicação na rotina para o tratamento das lesões de isquemia e reperfusão intestinal em equinos. Adicionalmente, a motivação de estudar os efeitos da glutamina advém de seu potencial efeito de acelerar a cicatrização da mucosa intestinal lesada e, dessa forma, complementar os potenciais efeitos da associação descrita anteriormente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

- CONSIDERAÇÕES GERAIS

A isquemia e reperfusão (IR) no intestino desencadeia efeitos intensos e complexos, em decorrência da absorção de endotoxinas e da ocorrência de distúrbios hidro-eletrolíticos e ácido-base, que se manifestam em órgãos à distância e cujo tratamento é mais difícil que a correção dos distúrbios isquêmicos ou ressecção cirúrgica intestinal (MOORE, 1999).

As enfermidades intestinais associadas a IR compreendem os infartos não estrangulantes e as obstruções estrangulantes (SULLINS et al., 1985). Os infartos intestinais não estrangulantes resultam de obstrução vascular e, nos equinos, sua causa é o tromboembolismo nas artérias mesentéricas devido a infestação por *Strongylus vulgaris*. Por outro lado, as obstruções estrangulantes, representadas por vólvulos, intussuscepções, torções e hérnias estranguladas, correspondem a 21% dos casos de abdome agudo, entretanto, com 76% de mortalidade associada (WHITE, 1990).

A isquemia é definida como a redução ou interrupção do fluxo sanguíneo, constituindo uma das principais causas de lesão tecidual (COTRAN et al., 1994; METZE, 1998). As alterações celulares são diretamente relacionadas à duração da isquemia e quando essa se prolonga por tempo suficiente acarreta necrose. Entretanto, quando a causa da isquemia é corrigida antes da ocorrência de alterações irreversíveis, o restabelecimento circulatório que caracteriza a reperfusão proporciona as condições para a normalização do metabolismo celular e da fisiologia do tecido (COTRAN et al., 1994, PEREIRA, 1998). Meschter et al. (1986) demonstraram que a reperfusão determina a recuperação completa das alterações produzidas no intestino delgado de equinos por isquemia total durante três horas, apesar da ocorrência de necrose na mucosa.

Paradoxalmente, no entanto, o restabelecimento circulatório pode não interromper imediatamente o agravamento das alterações devidas à isquemia, verificando-se, na verdade, sua intensificação com o retorno da circulação, o que é conhecido como lesão de reperfusão (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988; COTRAN et al., 1994). A relevância da lesão de reperfusão no intestino foi demonstrada primeiramente por em felinos, quando PARKS; GRANGER (1986) verificaram que as alterações teciduais produzidas durante a reperfusão foram maiores que aquelas produzidas durante a isquemia. Até o momento já foi demonstrado que, além do intestino, a lesão de reperfusão é importante na fisiopatologia dos distúrbios isquêmicos na musculatura cardíaca (MASSEY; BURTON, 1989; FERRARI et al., 1991) e esquelética (JEROME et al., 1994; NOVELLI et al., 1997), nos rins (WEIGHT et al., 1996) e na pele (RAND-LUBY et al., 1996), bem como na fisiopatologia das alterações observadas após transplantes de órgãos ou tecidos (MUELLER et al., 1993; CICALESE et al., 1996)

Em equinos, SERTEYN et al. (1990) e GLEED (1996) consideraram que a lesão de reperfusão é importante na miosite pós-anestésica e sua ocorrência já foi demonstrada experimentalmente no intestino. WHITE et al. (1980) constataram agravamento da lesão na mucosa intestinal durante a reperfusão, em segmentos de jejuno submetidos a períodos de isquemia de 30, 90 e 180 minutos. HORNE et al. (1994) verificaram que as alterações produzidas após quatro horas de isquemia experimental no jejuno foram menores que aquelas produzidas após três horas de isquemia e uma hora de reperfusão. Além disso, a ocorrência da lesão de reperfusão já foi demonstrada no cólon maior (MESCHTER et al., 1991; MOORE et al., 1994b) e no cólon menor (FALEIROS, 1997). Entretanto, outros estudos falharam em demonstrar a ocorrência de lesão de reperfusão após a isquemia intestinal em equinos (REEVES et al., 1990; WILKINS et al., 1994). Esse fato, somado à ineficácia, em equinos, de tratamentos que atenuam a lesão de reperfusão no intestino em outras espécies (ARDEN et al., 1990; FREEMAN et al., 1992; HORNE et al., 1994), levou ao questionamento sobre a relevância clínica da lesão de reperfusão no intestino de equinos (BLIKSLAGER et al., 1997; MOORE, 1997). Contudo, em um estudo conduzido por DABAREINER et al. (1998) foram demonstradas evidências da importância da lesão de reperfusão no jejuno de equinos. Esses autores produziram

isquemia de baixo fluxo por uma hora seguida de isquemia arterial total por uma hora. Ao final do período isquêmico as alças foram perfundidas com uma solução de comprovada eficiência em atenuar as alterações produzidas na microcirculação após isquemia e reperfusão no jejuno (DABAREINER et al., 1994). Após 10 dias de pós-operatório os animais foram eutanasiados, verificando-se que o tratamento reduziu significativamente a ocorrência de aderências intestinais.

- A FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES DE IR

A isquemia desencadeia alterações no tecido através da redução ou bloqueio da oferta de oxigênio, impedindo o metabolismo energético aeróbio. Esse fato determina a depleção dos níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP) e distúrbio da homeostase celular. Com a redução da energia disponível, ocorrem alterações na permeabilidade da membrana que permitem o influxo de sódio e cálcio e o efluxo de potássio da célula, levando a expansão citoplasmática e a degeneração hidrópica (COTRAN et al., 1994; PEREIRA, 1998).

O acúmulo de cálcio intracelular promove a ativação de proteases que degradam a membrana celular, a cromatina e o citoesqueleto, determinando também a ativação da fosfolipase A_2 . Essa enzima, além de lesar a célula diretamente através da ação sobre fosfolipídios da membrana, produz a liberação de ácido araquidônico, do fator de agregação plaquetária e da lisofosfatidilcolina (MOORE et al., 1995c).

O ácido araquidônico constitui substrato para síntese de eicosanóides, entretanto sua metabolização durante a isquemia é limitada (MANGINO et al., 1989). Por outro lado, o fator de agregação plaquetária e a lisofosfatidilcolina produzem efeitos nocivos diretos no tecido. O primeiro é um dos mais potentes mediadores da inflamação e, além de produzir agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular, exerce importantes efeitos nos neutrófilos como a quimiotaxia, a agregação intravascular, a degranulação e a produção do radical superóxido (COTRAN et al.,

1994). A lisofosfatidilcolina por sua vez é um surfactante de ocorrência natural no intestino, mas também é um produto da degradação de fosfolípidios capaz de produzir lesão da membrana celular (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988). O seu acúmulo no intestino isquêmico, bem como o seu potencial para produzir alteração na mucosa do intestino delgado já foram demonstrados (TAGESSON et al., 1985; OTAMIRI et al., 1987), e considera-se que a inibição da sua produção atenua as alterações decorrentes da IR nesse órgão (OTAMIRI; TAGESSON, 1989). Além do intestino, sua presença já foi demonstrada no miocárdio isquêmico, onde se considerou seu envolvimento na ocorrência de arritmias (SOBEL et al., 1978; FLAHERTY; WEISFELDT, 1988).

Com o retorno do aporte sanguíneo para o tecido, vários fatores atuam para o agravamento das lesões teciduais. Inicialmente considerou-se que a lesão de reperfusão era causada pela produção de quantidades aumentadas de radicais livres de oxigênio no tecido pós-isquêmico (PARKS; GRANGER, 1983; MCCORD, 1985).

Os radicais livres derivados do oxigênio (RLOs) são moléculas que possuem um elétron não emparelhado em seu orbital externo. Devido a essa característica esses são altamente reativos e podem produzir alterações celulares graves através da peroxidação de lipídios do citoplasma e da membrana celular, oxidação de proteínas e fragmentação de ácidos nucleicos. Os RLOs mais importantes são o superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH^-). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser um radical, participa dos processos de síntese e eliminação do O_2^- e do OH^- , além de também possuir potencial nocivo, sendo por isso considerado conjuntamente com os RLOs. A formação dessas moléculas constitui um processo fisiológico no organismo, durante o metabolismo aeróbio e outros processos metabólicos oxidativos. Além disso, os RLOs são sintetizados nos leucócitos e macrófagos através da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH-oxidase) em um processo conhecido como explosão respiratória, que constitui o principal mecanismo de eliminação de microorganismos fagocitados (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988; COTRAN et al., 1994; HALLIWELL, 1994; PEREIRA, 1998).

Apesar de seus efeitos nocivos, os RLOs não determinam alterações celulares em condições normais, visto que sua produção ocorre em quantidades limitadas e esses são eliminados prontamente através de sistemas antioxidantes. O O_2^- é convertido por ação da enzima superóxido dismutase a H_2O_2 , o qual é eliminado através das enzimas catalase e glutathione-peroxidase. Além desses mecanismos, o organismo dispõe de outros sistemas antioxidantes, dos quais participam o ácido ascórbico e o α -tocoferol. Essas vitaminas reagem com os radicais livres formando substâncias inativas, respectivamente ácido dehidroascórbico e tocoferol-semiquinonas. A eliminação rápida do O_2^- e do H_2O_2 evita a formação do OH^- , o qual é considerado como o RLO mais nocivo devido a sua extrema reatividade e à falta de um sistema enzimático específico para sua eliminação. Esse radical 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, a qual ocorre na presença de Fe^{++} ou Cu^+ (FLAHERTY; WEISFELDT, 1988; ROCHAT, 1991; COTRAN et al., 1994; PEREIRA, 1998).

O equilíbrio entre a eliminação de RLOs e sua produção é fundamental para manter a integridade dos tecidos. Quando há desequilíbrio os RLOs desencadeiam um processo chamado de estresse oxidativo, desencadeando alterações teciduais (ROCHAT, 1991; MCCORD, 1985; COTRAN et al., 1994; PEREIRA, 1998). Acredita-se que a produção aumentada de RLOs durante a reperfusão é resultado do acúmulo de hipoxantina durante a isquemia e da conversão da xantina desidrogenase, responsável pelo metabolismo das xantinas em condições normais, em xantina oxidase no tecido isquêmico. Com o retorno do oxigênio para os tecidos, a xantina oxidase catalisa a metabolização da hipoxantina em ácido úrico através de reações que dão origem à formação de O_2^- e H_2O_2 , desencadeando assim os mecanismos de alterações celulares já citados, tais como peroxidação lipídica, degradação de enzimas e de ácidos nucléicos e aumento da permeabilidade vascular (PARKS; GRANGER, 1983; ZIMMERMAN; GRANGER, 1992; COTRAN et al., 1994;).

Além dos RLOs outros fatores contribuem para a lesão de reperfusão. Com o retorno da perfusão sanguínea aumenta o influxo de cálcio para o meio intracelular, produzindo aumento expressivo na atividade da fosfolipase A_2 (OTAMIRI et al., 1987). Esse fato acentua a degradação da membrana celular e promove o agravamento das alterações teciduais através do aumento na produção de

lisofosfatidilcolina e do fator de agregação plaquetária (OTAMIRI; TAGESSON, 1989). Além disso, o ácido araquidônico liberado pela fosfolipase A₂ é metabolizado durante a reperfusão pela enzima cicloxigenase gerando prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, e pela enzima lipoxigenase, dando origem aos leucotrienos. Esses eicosanóides produzem efeitos vasoativos, predominando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, estímulo da agregação plaquetária e quimiotaxia para neutrófilos (COTRAN et al., 1994; MOORE et al., 1995c).

A ação dos eicosanóides, do fator de agregação plaquetária e a formação de radicais livres estimulam o acúmulo de neutrófilos no tecido pós-isquêmico. A adesão dessas células ao endotélio vascular na microcirculação, dificulta o fluxo sanguíneo local. Além disso, os neutrófilos determinam uma "segunda onda" de lesão por RLOs através da produção de O₂⁻ via NADPH-oxidase e sua liberação no tecido. Esse radical, além de produzir alterações teciduais diretamente, possibilita a formação do ácido hipocloroso pela mieloperoxidase liberada pelos neutrófilos, o qual é extremamente lesivo e origina cloraminas que também lesam o tecido (ZIMMERMAN; GRANGER, 1992; GRANGER; KORTHUIS, 1995; INOUE et al., 1998).

O óxido nítrico (NO) também pode estar envolvido no processo de IR (COTRAN et al., 1994; GRANGER; KORTHUIS, 1995). Essa molécula é encontrada no endotélio vascular, neurônios especializados, leucócitos e macrófagos, onde em condições normais é sintetizada pela enzima óxido nítrico sintetase constitucional através da oxidação da L-arginina. No intestino, o NO produz inibição da motilidade através da inervação nitrérgica (RAKESTRAW et al., 1996), mas sua função primordial nos tecidos consiste na regulação do fluxo sanguíneo através do relaxamento da musculatura vascular, além de reduzir a adesividade de neutrófilos ao endotélio vascular, inibir a formação de microtrombos e antagonizar o vasoespasmo produzido por substâncias vasoconstritoras (BRYANT; ELLIOTT, 1994; WONG; BILLIAR, 1995). Na inflamação a síntese de NO é aumentada pela ativação da enzima óxido nítrico sintetase indutível, quando então esse passa a exercer efeitos indesejáveis através da interferência na regulação da circulação local e sistêmica ou da produção de moléculas altamente reativas como os radicais hidroxil e dióxido de nitrogênio e o ânion peroxinitrito (COTRAN et al., 1994; WONG; BILLIAR, 1995). Contudo, Kubes (1993) e Mueller et al. (1994b) demonstraram que o NO

atenua a injúria de reperfusão no intestino delgado e segundo Li et al. (1996) esse atenua a lesão de reperfusão no miocárdio. White (1995) considerou que o papel do óxido nítrico na IR intestinal ainda é controverso.

Apesar de já ter sido acumulado razoável volume de conhecimento sobre os efeitos da IR no intestino de equinos, pouco se conhece a respeito da sua fisiopatologia nessa espécie (MOORE et al., 1995c; WHITE, 1995; VATISTAS et al., 1998).

Ao contrário do que se observa em outras espécies (GRANGER et al., 1986; MEGISON et al., 1990), até o momento a importância dos RLOs na IR intestinal em equinos permanece especulativa. O aumento da atividade da xantina oxidase já foi demonstrada durante a isquemia no jejuno de equinos (PRICHARD et al., 1991), entretanto estudos posteriores realizados no intestino delgado (VATISTAS et al., 1998) e cólon maior (WILKINS et al., 1994) não confirmaram esse achado. Além disso, apesar da eficiência do tratamento com antagonistas da xantina oxidase ou de RLOs em atenuar a lesão de reperfusão no intestino de cães (BOROS et al., 1993), de gatos (PARKS; GRANGER, 1983; GRANGER et al., 1986) ou de ratos (MEGISON et al., 1990; STONE et al., 1992), essas drogas foram ineficientes em repetidos estudos realizados no intestino delgado (ARDEN et al., 1990; FREEMAN et al., 1992; HORNE et al., 1994) e no cólon maior de equinos (HENNINGER et al., 1991; FREEMAN et al., 1992; MOORE et al., 1995a), permitindo supor que os RLOs não constituem uma causa importante de lesão durante a IR intestinal nessa espécie.

A importância dos neutrófilos nas lesões de IR no intestino de equinos também não foi ainda confirmada. MESCHTER et al. (1986) verificaram aumento na quantidade de neutrófilos na mucosa e na submucosa do intestino de equinos acometidos de abdome agudo e, além disso, seu acúmulo no cólon maior após IR experimental foi demonstrado por MOORE et al. (1994a) e WILSON et al. (1994). Entretanto, nesses estudos o aumento do número de neutrófilos foi classificado como leve e os autores consideraram que esse poderia não estar relacionado à ocorrência de lesões teciduais, mas ser apenas componente do processo inflamatório desencadeado pela isquemia. Além disso, em gatos, onde a relevância dos neutrófilos na IR intestinal é bem estabelecida (HERNANDEZ et al., 1987b), a maior parte das alterações atribuídas aos neutrófilos é produzida pelos neutrófilos

residentes, sendo que aqueles que chegam ao tecido durante a IR possuem capacidade limitada de determinar alterações teciduais (KUBES et al., 1992). Segundo Blikslager et al. (1997) esse achado, quando extrapolado para a espécie eqüina, permite considerar a possibilidade de que os neutrófilos não são importantes na produção de alterações teciduais durante a IR intestinal nessa espécie, uma vez que a população de neutrófilos residente no intestino de equinos é reduzida.

O fator de agregação plaquetária produz alterações hemodinâmicas em equinos, já tendo sido comprovado que esse efeito pode ser prevenido através da utilização do antagonista específico WEB 2086 (WILSON et al., 1993). Contudo, esse antagonista não atenuou as alterações teciduais verificadas após IR no cólon maior (WILSON et al., 1993) e, até o momento, nenhum estudo quantificou sua presença no intestino de equinos durante a IR, impedindo estabelecer a sua importância nesse processo. Da mesma forma, não foram realizados até o momento estudos que permitam estabelecer a importância da fosfolipase A_2 , ou da lisofosfatidilcolina na IR intestinal em equinos. O aumento da produção da prostaglandina E_2 , da prostaciclina I_2 e do tromboxano B_2 no cólon maior de equinos durante a IR foi demonstrado por MOORE et al. (1995b) e por Stick et al. (1992), entretanto esses autores não estudaram sua importância na produção de alterações teciduais.

Com respeito ao NO, poucos estudos foram realizados até o momento para avaliar sua importância durante a IR intestinal em equinos. Mirza et al. (1997) demonstraram sua produção aumentada no cólon maior de equinos durante a IR, contudo, em um estudo posterior não foi verificado aumento das concentrações de NO no plasma, líquido peritoneal ou urina de equinos portadores de torção do cólon maior (MIRZA et al., 1998).

Apesar de sua importância clínica não estar ainda estabelecida, a ocorrência de apoptose após IR no intestino tem sido relatada em ratos (KETAN et al., 1997; IKEDA et al., 1998), e em equinos (ABREU et al., 2007), podendo também constituir um componente importante na fisiopatologia dessas lesões.

- ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DURANTE A IR NO INTESTINO

Os efeitos da IR intestinal se manifestam de maneira mais severa e precoce na mucosa e na submucosa (MESCHTER et al., 1986; MITSUDO; BRANDT, 1992). As alterações histológicas mais precoces decorrentes da IR na mucosa do intestino consistem na redução da altura das vilosidades e a separação entre o epitélio e a lâmina própria na extremidade das vilosidades, dando origem à formação do espaço subepitelial de Gruenhagen (WHITE et al., 1980; HAGLUND et al., 1987). À medida que a IR se intensifica, o epitélio se destaca na extremidade das vilosidades deixando a lâmina própria exposta. Em seguida, ocorre perda progressiva do epitélio em direção à base das vilosidades e se o processo de IR não é interrompido, verifica-se destruição das vilosidades e, a seguir, das criptas intestinais, levando à necrose completa da mucosa (CHIU et al., 1970).

Além das lesões no epitélio intestinal são verificadas outras alterações. A riqueza vascular na mucosa e na submucosa predispõe à ocorrência de hemorragia nessas camadas e a predominância de tecido conjuntivo frouxo na submucosa favorece a ocorrência de edema (SNYDER et al., 1988). As alterações produzidas durante a IR determinam aumento da permeabilidade vascular e lesões vasculares, o que desencadeia a formação de edema e hemorragia. Quando a isquemia tem origem arterial, como nos casos de infarto não estrangulativo, a ocorrência de edema e de hemorragia durante a isquemia são limitados, devido à interrupção do fluxo sanguíneo. Por outro lado, quando a isquemia é causada principalmente por obstrução venosa, como o que acontece nos casos de obstruções estrangulantes, o aumento da pressão hidrostática na vasculatura proporciona a formação de edema e hemorragia intensos (SULLINS et al., 1985). Com o restabelecimento circulatório essas alterações se intensificam devido ao agravamento das lesões vasculares produzido pela ação de RLOs, de mediadores da inflamação e dos neutrófilos, e quando a reperusão se segue à isquemia de origem arterial, devido também ao restabelecimento da pressão hidrostática (METZE, 1998). Além dessas alterações, verifica-se a marginação e agregação de neutrófilos na vasculatura do intestino devido à quimiotaxia, sendo que, com a evolução da IR, pode-se observar sua

presença aumentada também no interstício. Apesar de MESCHTER et al. (1986) terem verificado a presença de intensos infiltrados de neutrófilos na mucosa e na submucosa do intestino em equinos portadores de abdome agudo de ocorrência natural, nos estudos experimentais realizados até o momento sua presença no intestino durante a IR, apesar de aumentada, têm sido classificada como leve (MOORE et al., 1994a; WILSON et al., 1994; FALEIROS, 1997).

As alterações decorrentes da IR na camada muscular do intestino são reduzidas. Ao exame histopatológico no intestino de equinos portadores de abdome agudo, Meschter et al. (1986) verificaram a presença de alterações irrelevantes nessa camada e Verastegui (1995) considerou que essa é resistente à isquemia, sendo observadas alterações importantes na camada muscular somente após a necrose completa da mucosa. Com relação à serosa, já foi demonstrado que a IR produz inflamação, perda do mesotélio, infiltração de neutrófilos e pode determinar o desenvolvimento de aderências nessa camada do intestino (LUNDIN et al., 1989; RUGGLES et al., 1993; DABAREINER et al., 1998).

Se os efeitos da IR são mantidos por um período prolongado, a necrose observada na mucosa se estende para as outras camadas, produzindo necrose completa da parede intestinal (ALLEN; TYLER, 1990).

- TERAPÊUTICA DAS LESÕES DE IR NO INTESTINO

O tratamento da isquemia intestinal consiste no restabelecimento circulatório, usualmente através de cirurgia (SHIRES, 1984), mas, por outro lado, a terapêutica medicamentosa durante essa fase da IR no intestino é limitada. Os tratamentos empregados com esse objetivo até o momento consistiram em tentativas de manutenção do metabolismo energético no tecido isquêmico através da administração intra-luminal de oxigênio ou de glicose (VERASTEGUI, 1995). Esse tratamento reduziu a intensidade das lesões produzidas após isquemia experimental por duas horas em ratos (SHUTE, 1976) e por uma hora e meia em cães (CHIU et

al., 1970b). A terapêutica da IR durante a fase de isquemia têm sido realizada na rotina no âmbito das cirurgias de transplantes ou vasculares, quando é possível antecipar a ocorrência da isquemia (MUELLER et al., 1994a; NOVELLI et al., 1997).

Uma vez corrigida a causa da isquemia, a terapêutica da lesão de reperfusão pode ser realizada por via sistêmica e vários tratamentos têm sido testados com algum sucesso. O tratamento nessa fase tem como principais objetivos evitar a formação de RLOs e/ou promover a sua eliminação, inibir a ativação da fosfolipase A₂ ou os efeitos de seus produtos, e inibir o acúmulo de neutrófilos na vasculatura e sua migração para o tecido (FORSYTH; GUILFORD, 1995; MOORE et al., 1995b; WHITE, 1995).

O bloqueio da produção de RLOs têm sido obtido através da utilização de antagonistas da enzima xantina-oxidase como o alopurinol (MEGISON et al., 1990), ou pela inibição da formação de OH⁻ através da utilização de agentes quelantes do Fe⁺⁺, como a deferoxamina (HERNANDEZ et al., 1987a; LANTZ et al., 1992). Adicionalmente, agentes antioxidantes tais como a enzima superóxido dismutase (STONE et al., 1992), o dimetilsulfóxido (PARKS; GRANGER, 1983) e os 21-aminoesteróides (BADYLAK et al., 1990) têm demonstrado ser eficientes, e Inoue et al. (1998) comprovaram que o ácido ascórbico protege a mucosa do cólon maior contra os efeitos nocivos do ácido hipocloroso *in vitro*. O α -tocoferol não foi ainda testado na IR intestinal, mas previne seus efeitos no miocárdio (MASSEY; BURTON, 1989)

A inibição dos efeitos da IR através do bloqueio da fosfolipase A₂ já foi demonstrada com o uso da quinacrina (OTAMIRI et al., 1988; OTAMIRI; TAGESSON, 1989) e de glicocorticóides (GAFFIN et al., 1986), e Moore et al. (1995c) consideraram que a administração de antagonistas da ciclooxigenase e da lipoxigenase, além de antagonistas do fator de agregação plaquetária, podem atenuar as lesões decorrentes de IR. Em gatos a inibição do acúmulo de neutrófilos atenua os efeitos da IR no intestino, e essa tem sido realizada através do bloqueio na produção de agentes quimiotáticos como o leucotrieno B₄ (ZIMMERMAN et al., 1990) e o fator de agregação plaquetária (KUBES et al., 1990), além da prevenção

da sua aderência na vasculatura através de anticorpos monoclonais contra moléculas de adesão da sua superfície (KURTEL et al., 1992).

- TERAPÊUTICA DAS LESÕES DE IR NO INTESTINO DE EQUINOS

Vários agentes terapêuticos demonstraram eficácia em atenuar os efeitos da IR no intestino em outras espécies, entretanto, a maioria dos tratamentos testados em equinos não obtiveram sucesso. Dentre os tratamentos testados para atenuar os efeitos da IR no intestino de equinos, o único que produziu resultados satisfatórios foi o "Carolina rinse", uma solução que tem sido empregada durante transplantes de fígado em humanos. Essa solução combina agentes antioxidantes (alopurinol, glutathione e desferoxamina), substratos para o metabolismo energético (frutose e glicose), um bloqueador de canais de cálcio (nicardipina) e um vasodilatador (adenosina). Sua administração na artéria mesentérica do segmento intestinal afetado inibe a ocorrência de distúrbios da permeabilidade vascular e de alterações no endotélio vascular durante a reperfusão (DABAREINER et al., 1994, WHITE, 1995). Além disso, foi demonstrado que seu emprego reduz a ocorrência de aderências pós-operatórias após IR experimental do intestino delgado (DABAREINER et al., 1998). No entanto, considera-se que a administração de "Carolina rinse" não é prática em segmentos longos do intestino, e sua administração sistêmica produz efeitos indesejáveis (DONALDSON et al., 1998), sendo que, além disso, não existem informações a respeito da disponibilidade desse composto no mercado nacional.

Os 21-aminoesteróides foram eficazes em um estudo realizado por Vatistas et al. (1993) no cólon maior, contudo estudos posteriores não confirmaram esses resultados no cólon maior (MOORE et al., 1995a) e no jejuno (HORNE et al., 1994; VATISTAS et al., 1996).

Moore et al. (1980) verificaram que a administração de oxigênio intraluminal foi eficaz em prevenir a lesão de reperfusão apenas após períodos de isquemia menores que uma hora, o que foi confirmado por Horne et al. (1994). Devido aos resultados insatisfatórios obtidos com o tratamento da IR no intestino de equinos,

Blikslager et al., (1997) sugeriram que os estudos na terapêutica dessas lesões devem ser voltados para acelerar a reparação da mucosa.

- **Potenciais agentes terapêuticos para a isquemia e reperfusão no intestino de equinos**

Considerando seus potenciais efeitos benéficos com base em estudos realizados em outras espécies e em equinos, foram identificados agentes considerados promissores para o tratamento da IR no intestino,

Os efeitos benéficos da hidrocortisona nas lesões de IR intestino já foram demonstrados por Rio Tinto, (1999), Faleiros (2003) e Pagliosa (2009). Segundo Behrend; Kemppainen (1997) o succinato sódico de hidrocortisona (SSH) é um glicocorticóide que possui rápido início de ação e meia-vida biológica de menos de 12 horas. Seus efeitos são semelhantes ao de outros glicocorticóides, entretanto sua potência é 30 vezes menor que a da dexametasona, sendo sua atividade mineralocorticóide superior. Essa droga tem sido recomendada quando é necessário um rápido início de ação. Em equinos, sua utilização foi preconizada por Robinson (1992) na dosagem de 4mg/kg por via intravenosa. Os efeitos benéficos dos glicocorticóides durante a IR no intestino têm sido considerados.

Segundo Haglund (1975) a utilização de doses elevadas de glicocorticóides reduz a intensidade das lesões na mucosa do intestino delgado de cães durante o choque e Gaffin et al. (1986) demonstraram que sua administração preveniu a absorção de endotoxinas em gatos submetidos a IR do intestino delgado. Além disso, Grisham; Granger, (1988) propuseram que a utilização de glicocorticóides pode atenuar os efeitos da IR no intestino pela inibição da infiltração de neutrófilos no tecido pós-isquêmico e Forsyth; Guilford, (1995) consideraram que, além de seus potenciais efeitos no processo inflamatório e na atividade dos neutrófilos, esses reduzem a intensidade das alterações vasculares durante a IR. Moore et al. (1995c) consideraram que os glicocorticóides poderiam atenuar os efeitos da IR no intestino

de equinos. Os glicocorticóides são potentes inibidores da atividade da fosfolipase A₂, exercendo esse efeito através da indução da síntese de lipocortinas. Desse modo sua ação inibe a degradação dos fosfolípidios da membrana celular, a formação de lisofosfatidilcolina e do fator de agregação plaquetária (MANSBACH, 1990).

Já foi demonstrado por Otamiri et al. (1987) que a utilização de inibidores específicos da fosfolipase A₂ reduz a síntese de lisofosfatidilcolina no intestino delgado durante a IR e segundo Otamiri; Tagesson (1989) sua utilização atenua os efeitos da IR no intestino delgado, sendo mais eficiente que a administração de catalase e superóxido dismutase combinadas. Além disso os glicocorticóides estão entre as drogas antiinflamatórias mais potentes disponíveis, uma vez que inibem a síntese de eicosanóides pelas vias da cicloxigenase e da lipoxigenase (HIGGINS; LEES, 1984; MAY, 1992).

Os glicocorticóides reduzem a produção de selectinas e integrinas pelos neutrófilos, inibindo a sua agregação na vasculatura e sua migração para os tecidos (BURTON; KEHRLI, 1995), e, de acordo com Burguez et al. (1983), esse efeito é responsável pela leucocitose usualmente verificada após sua administração. Além disso, essas drogas estabilizam a membrana lisossomal, inibem a liberação do seu conteúdo (McDONALD, 1992; GOLDFIEN, 1994), reduzem a permeabilidade vascular (GOLDFIEN, 1994; BEHREND; KEMPPAINEN, 1997) e diminuem a produção do fator de necrose tumoral e das interleucinas 1 α e 1 β por leucócitos mononucleares (LEW et al., 1988).

O dimetilsulfóxido é um agente que possui efeitos antiinflamatório e de sequestrar radicais livres, e é utilizado para o tratamento do abdome agudo na rotina clínico-cirúrgica. Vários estudos sobre IR já foram conduzidos testando sua eficácia com resultados desapontadores no jejuno (ARDEN et al., 1989; ARDEN et al., 1990; HORNE et al., 1994) e no cólon maior (REEVES et al., 1990; MOORE et al., 1995a). Entretanto, Dabareiner et al. (2005) demonstraram sua eficácia em reduzir a permeabilidade vascular no jejuno e Sullins et al. (2004) demonstraram que na dose de 20mg/Kg IV o dimetilsulfóxido reduziu a ocorrência de aderências após IR no intestino delgado de potros.

Não foram realizados ainda estudos *in vivo* acerca dos efeitos do ácido ascórbico na IR de equinos, mas Inoue et al., (1998), em um estudo *in vitro* constataram que o ácido ascórbico preveniu a ocorrência de lesão induzida pelo ácido hipocloroso na mucosa. Byrca-Owczarec et al. (2004), em um estudo sobre a terapêutica da IR em coelhos, empregaram o ácido ascórbico na dose de 250mg/Kg, e apesar de não terem observado redução nos escores para lesão na mucosa, verificaram diminuição no edema e hemorragia na submucosa. Ozaki et al. (1995), em um estudo de IR no fígado de ratos, observaram redução na peroxidação lipídica com a utilização de ácido ascórbico uma hora antes do início da isquemia.

A pentoxifilina é um derivado da teobromina que possui propriedades hemorreológicas, melhorando o fluxo sanguíneo e a deformabilidade das hemácias, além de reduzir a viscosidade do sangue, a adesão e degranulação de neutrófilos, a formação do radical superóxido, além de inibir a produção do fator de necrose tumoral, interleucinas e tromboplastina (BARTON et al., 1997). Sua ação benéfica na IR intestinal em equinos já foi demonstrada em equinos por Abreu, (2003), utilizando modelo de ISQ-V, em que essa droga atenuou a hemorragia na mucosa e o edema na submucosa, resultando em uma recuperação mais precoce da mucosa.

A glutamina é um aminoácido não essencial e que constitui a principal fonte de energia para os enterócitos, sendo de vital importância na reparação da mucosa intestinal (MAZZAFERRO et al, 2000). Sua eficácia no tratamento da IR no intestino de equinos foi testada por Pagliosa, (2009), e foi demonstrado que sua administração na dose de 25mg/Kg antes do início da reperfusão e novamente após 6 horas de reperfusão contribuiu para a recuperação da mucosa do jejuno.

- **MODELOS EXPERIMENTAIS DE IR NO INTESTINO DE EQUINOS**

Os efeitos da IR no intestino de equinos têm sido reproduzidos através de modelos experimentais que apresentam particularidades quanto à intensidade e o tipo de isquemia produzida (HORNE et al., 1994; VATISTAS et al., 1996).

O modelo de IR que utiliza isquemia venosa (ISQ-V) é o que melhor reproduz as alterações verificadas nas obstruções intestinais estrangulantes, uma vez que nessas enfermidades a compressão externa do intestino determina primeiramente a interrupção do fluxo sanguíneo venoso, devido à menor pressão na circulação venosa (HORNE et al., 1994; MOORE et al., 1995c). Como a circulação arterial continua por algum tempo após o desencadeamento da enfermidade, ocorre aumento da pressão hidrostática formando de edema e hemorragia pronunciados (SULLINS et al., 1985, ALLEN; TYLER, 1990). Nesse modelo de IR a isquemia é produzida através da interrupção apenas da circulação venosa e, com o início da isquemia, o intestino se torna arroxeadado e, a seguir, vermelho escuro, devido a congestão e hemorragia intensos. A evolução da isquemia determina espessamento e aumento da extensão do intestino, em decorrência da congestão, edema e hemorragia, além de redução da motilidade intestinal, extravasamento e acúmulo de sangue intraluminal. Com o restabelecimento circulatório diminui a alteração de cor e o intestino torna-se vermelho-claro, mas não são verificadas alterações significativas na intensidade do edema e da hemorragia (SULLINS et al., 1985; FREEMAN et al., 1988).

O modelo experimental de IR que mais aproxima das alterações devidas aos infartos não estrangulantes, onde a isquemia é desencadeada pela obstrução arterial, é o que utiliza isquemia artériovenosa (ISQ-AV) (HORNE et al., 1994; MOORE et al., 1995c). Nesse modelo de IR a isquemia é produzida pela interrupção arterial e venosa simultaneamente, o que resulta em congestão, edema e hemorragia de menor intensidade, em contraste com o que resulta da ISQ-V. Com o início da isquemia, o intestino torna-se arroxeadado, observando-se edema discreto e redução progressiva da motilidade. Durante a reperfusão o intestino retorna rapidamente a sua cor original e a motilidade restabelece progressivamente, mas pode ser verificada discreta hiperemia e intensificação do edema (FREEMAN et al., 1988; VATISTAS et al., 1996).

Os modelos de IR utilizando ISQ-V e ISQ-AV produzem lesão de intensidade semelhante na mucosa do jejuno (HORNE et al., 1994). A ocorrência de lesão de reperfusão em modelos de IR utilizando ISQ-V no jejuno já foi demonstrada por Freeman et al. (1992) e por Horne et al. (1994), no entanto, o mesmo não foi verificado por Laws; Freeman (1994). Da mesma forma, a ocorrência de lesão de

reperusão no jejuno após a utilização de ISQ-AV já foi demonstrada por Horne et al. (1994) e por Kooreman et al. (1998), mas o mesmo não foi verificado por Vatistas et al. (1996).

Em contraste com os modelos de isquemia total, o modelo de isquemia de baixo fluxo (IBF) acarreta a produção de alterações de menor intensidade, facilitando a evidência da lesão de reperusão (PARKS et al., 1982; MOORE et al., 1994b; VATISTAS et al., 1996). Além disso, a IBF permite simular as alterações decorrentes de enfermidades que produzem obstrução incompleta do fluxo sanguíneo local ou de estados de hipoperfusão esplâncnica generalizada (ARDEN et al., 1990). Esse modelo de isquemia compreende a redução do fluxo arterial para 20 a 25% do seu limite basal (DABAREINER et al., 1995; VATISTAS et al., 1996; DABAREINER et al., 1998b).

A distensão intestinal também pode ser utilizada para produzir IBF uma vez que essa produz compressão na circulação mural (ALLEN; TYLER, 1990). Segundo Dabareiner et al. (1998a), a distensão do jejuno até a pressão de 18cmH₂O reduz o fluxo sanguíneo mural em aproximadamente 40% e a distensão/descompressão do jejuno produz aumento da permeabilidade vascular, da formação de edema e da presença de neutrófilos na serosa.

- AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IR NO INTESTINO

Os efeitos da IR no intestino delgado de equinos têm sido avaliados através de parâmetros histomorfológicos, histomorfométricos, laboratoriais (WHITE et al., 1980; HORNE et al., 1994; SEQUEIRA et al., 1994b; DABAREINER et al., 1995; VATISTAS et al., 1996) e anatomopatológicos (DABAREINER et al., 1998b).

As alterações histológicas produzidas durante as fases de isquemia e de reperusão são semelhantes, permitindo sua diferenciação apenas através de aspectos temporais (SISLEY et al., 1994). O método mais utilizado para o estudo da IR no intestino delgado de equinos consiste na avaliação do grau de lesão na mucosa e sua quantificação por meio de escores. Esse método foi proposto inicialmente por Chiu et al. (1970a) em cães e desde então têm sido amplamente utilizado,

permitindo estabelecer comparações entre diferentes estudos (MOORE et al., 1980; WHITE et al., 1980; SULLINS et al., 1985; MESCHTER et al., 1986; FREMAN et al., 1988; ARDEN et al., 1990; HORNE et al., 1994). Além disso, Meschter et al. (1986) e Sequeira et al. (1994a) consideraram que o grau de lesão está relacionado à severidade do quadro clínico, permitindo prognosticar a evolução das lesões. Outras alterações como a presença de hemorragia, de edema ou de neutrófilos nas diferentes camadas do jejuno já foram descritas em equinos após IR experimental ou casos de abdome agudo de ocorrência natural (SULLINS et al., 1985; MESCHTER et al., 1986; LUNDIN et al., 1989), entretanto essas alterações não foram ainda quantificadas no intestino delgado.

A histomorfometria têm sido utilizada na avaliação das alterações decorrentes de IR nos cólons maior (MOORE et al., 1995a) e menor (FALEIROS, 1997), e Vatistas et al. (1996) utilizaram essa técnica no jejuno. Hoogmoed; Snyder (1998) demonstraram que a histomorfometria apresenta boa correlação com a severidade das enfermidades presentes no cólon maior durante o abdome agudo e que sua utilização permite prognosticar a evolução do quadro clínico. No entanto, segundo Moore et al. (1994a) a heterogeneidade da distribuição das alterações no tecido pode prejudicar a eficiência dessa técnica e esses recomendaram sua associação à histomorfologia.

Sendo o malondialdeído (MDA) e os dienes conjugados (DieC) produtos da peroxidação lipídica, e a polimerização da diaminobenzidina (DAB) indicativa da formação de O_2^- , segundo Kooreman et al. (1998) a presença dessas substâncias no tecido constitui um indicador da formação de RLOs e, indiretamente, da intensidade da lesão de reperfusão. A concentração aumentada desses indicadores na mucosa do jejuno durante a reperfusão foi demonstrada por Kooreman et al. (1998) após duas horas de ISQ-AV, mas Vatistas et al. (1996) não verificaram resultados semelhantes utilizando o mesmo tempo de ISQ-AV ou IBF e Laws; Freeman, (1994) não verificaram aumento do MDA na mucosa durante a reperfusão, após 90 minutos de ISQ-V.

A mieloperoxidase (MPO), por sua vez, é uma enzima presente nos leucócitos que catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio e íon Cl^- em ácido hipocloroso e considera-se que sua presença no tecido durante a IR é um indicador da presença de

neutrófilos (MOORE et al., 1994a; YARBROUGH et al., 1994). VATISTAS et al. (1996) demonstraram aumento da atividade da MPO durante a reperfusão em segmentos do jejuno submetidos a IBF, entretanto, não foi verificado resultado semelhante em segmentos submetidos a ISQ-AV. Em contraste, Laws; Freeman, (1994) demonstraram aumento de MPO em segmentos do jejuno submetidos a ISQ-V mas não foi verificado seu aumento durante a reperfusão.

O coeficiente de reflexão osmótica tem sido utilizado para avaliar a intensidade das alterações decorrentes da IR na permeabilidade vascular em modelos experimentais empregando IBF no jejuno (DABAREINER et al., 1995; DABAREINER et al., 1998b).

As alterações decorrentes da IR no intestino delgado já foram também estimadas através de parâmetros anatomopatológicos por Lundin et al. (1989) e Dabareiner et al. (1998b), que quantificaram a presença de aderências 10 dias após o episódio isquêmico, e por Freeman et al. (1988), que verificaram a presença de alterações mais intensas em segmentos do jejuno submetidos a ISQ-V do que naqueles submetidos a ISQ-AV, após 42 dias do episódio isquêmico.

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo testar a eficácia da glutamina ou da associação de hidrocortisona, ácido ascórbico, dimetilsulfóxido e pentoxifilina em atenuar as lesões decorrentes de isquemia venosa total e reperfusão experimentais no cólon maior de equinos, com vista ao estabelecimento de um protocolo terapêutico coadjuvante a ser empregado por via sistêmica, para utilização em equinos acometidos de abdome agudo. Para tanto, o presente estudo foi delineado para permitir testar as seguintes hipóteses:

- As lesões decorrentes de duas horas de isquemia venosa total seguidas de duas horas de reperfusão no cólon são atenuadas pelo tratamento com a glutamina ou com a associação de hidrocortisona, ácido ascórbico, dimetilsulfóxido e pentoxifilina.
- A intensidade das lesões teciduais observadas no cólon após 12 horas de reperfusão é menor nos animais tratados com a glutamina ou a associação de hidrocortisona, ácido ascórbico, dimetilsulfóxido e pentoxifilina

4 MATERIAIS E MÉTODOS

- CONDIÇÕES DO EXPERIMENTO E COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi executado por meio de parceria entre a Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais -Unidade Betim (PUC Minas Betim) e a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). A fase experimental foi realizada no Hospital Veterinário da PUC Minas Betim, sendo o processamento das amostras efetuado na EV-UFMG.

O delineamento experimental e os resultados apresentados no presente estudo constituem parte de um projeto maior, idealizado para permitir melhor aproveitamento do potencial dos animais experimentais e a otimização de recursos humanos e financeiros. Dessa forma, os animais do presente estudo foram submetidos simultaneamente a isquemia e reperfusão no cólon e no jejuno, proporcionando um volume de informações para dois estudos a serem apresentados isoladamente. O presente estudo foi constituído pelo delineamento e resultados referentes ao cólon. O delineamento e resultados concernentes ao jejuno constituíram outro estudo, cuja apresentação foi realizada separadamente.

Para constituir os grupos experimentais foram utilizados 18 equinos, de ambos os sexos, sem raça definida, procedentes da região de Lavras/MG, e caracterizados na tabela 1. Após a aquisição, os animais permaneceram durante aproximadamente 14 meses em piquetes coletivos na fazenda experimental da PUC Minas Betim no município de Esmeraldas/MG. No mínimo quinze dias antes de serem operados os animais foram trazidos para o Hospital Veterinário da PUC Minas Betim, e após exame clínico e hematológico para constatar sua sanidade, foram vermifugados com moxidectina¹ na dose de 0,4 mg/kg, e a seguir permaneceram em piquetes coletivos onde dispuseram de feno de *coast cross* à vontade.

¹/Equest - Fort Dodge Saúde Animal.

Tabela 1 - Características dos equinos utilizados no experimento e sua distribuição nos grupos experimentais – Betim – 2006/2007

Grupo Controle (C)					Grupo Glutamina (G)					Grupo Associação (Ass)				
Equino	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Escore ¹	Equino	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Escore	Equino	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Escore
3	F	7	255	4	12	F	9	295	4	18	F	7	280	4
7	F	5	318	4	13	F	10	350	4	15	F	11	303	4
19	M	7	240	4	17	M	3	308	3	1	M	4	325	4
5	M	12	251	4	10	M	8	250	4	4	M	9	345	4
8	F	6	321	4	6	F	3	280	4	9	F	6	315	4
16	F	13	290	4	11	F	12	278	4	14	F	11	255	4
Médias±SD ²		8,3 ±3,3a	279 ±35a	4,0 ±0,0a			7,5 ±3,7a	293 ±33a	3,8 ±0,4a			8,0 ±2,8a	303 ±32a	4,0 ±0,0a

¹Escore corporal (Spiers, 1995) 1- Caquético, 2- Magro, 3- Bom, 4- Gordo, 5- Obeso

²Para cada variável, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si p< 0,05

Os equinos foram distribuídos em seis trios, de forma que seus componentes fossem o mais semelhantes possível no que se refere à idade, escore corporal e peso. Os componentes de cada trio foram separados por sorteio em três grupos de seis equinos, que constituíram os Grupos experimentais controle (C), glutamina (G) e associação (A).

- ANESTESIA

Em jejum alimentar por 12h, e após terem sido medicados com 6,6mg/kg de gentamicina¹ IV e 20.000UI/Kg de penicilina procaína² IM, os equinos receberam 0,15 mg/kg de midazolam³ através de um cateter fixado na veia jugular esquerda e, imediatamente após, receberam pela mesma via, solução de éter gliceril guaiacol⁴ (EGG) a 10% em solução de glicose a 5%, sob pressão, até produzir-se o decúbito, quando sua administração foi interrompida. A seguir procedeu-se a intubação

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

²Despasilina. Bristol Myers Squibb S.A. São Paulo, SP.

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

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

orotraqueal e a sonda foi conectada a um circuito anestésico semi- fechado, onde a indução e a manutenção da anestesia foram realizados com isoflurano¹ volatilizado em vaporizador termocompensado

Durante a manutenção da anestesia foram fornecidos 15ml/kg/min de oxigênio e administrou-se solução de Ringer com lactato por via intravenosa (IV) na dose de 10ml/kg/h. Foi realizada monitoração constante da pressão arterial pelo método direto (HUBBEL, 1991), da saturação da oxihemoglobina utilizando oximetria de pulso, e da concentração de CO₂ ao final da expiração por capnografia, sendo estabelecidos os limites mínimos de 70mmHg para a pressão arterial média e de 90% para a saturação da oxihemoglobina. A concentração de CO₂ ao final da expiração foi mantida entre 35 e 50mmHg. Quando necessário, procedeu-se à administração de dobutamina² na dose de 1 a 5 mcg/kg/min para a elevação da pressão arterial, e realizou-se ventilação controlada para a elevação da saturação da oxihemoglobina e manutenção da ETCO₂ dentro dos limites pré-estabelecidos.

- MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Os componentes dos Grupos controle, associação e glutamina foram operados intercaladamente, pela mesma equipe cirúrgica. Por meio de uma celiotomia mediana pré-umbilical de aproximadamente 40cm, foi realizada a exteriorização de um segmento de aproximadamente 35cm do cólon ventral esquerdo, flexura pélvica e 35cm do cólon dorsal esquerdo, mantendo-se o intestino com a face visceral voltada para cima. Um segmento compreendendo aproximadamente 20cm dos cólons ventral e dorsal esquerdos e a flexura pélvica foi demarcado com pontos de catgut cromado nº 0, identificando o segmento a ser instrumentado. Na margem do segmento demarcado foi aplicada uma braçadeira de esfigmomanômetro³ tamanho adulto com manguito inflável. Uma das extremidades do manguito permaneceu conectada a um manômetro aneróide e a outra foi conectada a uma válvula de ar.

¹Isoflurano. Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP.

²Dobutrex. Hipolabor Farmacêutica. Belo Horizonte, MG.

³Esfigmomanômetro Press Control Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP.

Figura 1 - Cólón maior do eqüino experimental nº 19 após duas horas de isquemia. Observa-se o manguito inflado e o posicionamento do sensor de temperatura (seta) – Betim – 2006/2007

Após a confirmação da presença de fluxo arterial e venoso no segmento experimental, por meio de um aparelho de ultrassom Doppler¹ (FREEMAN et al. 1988) e sob contínua monitoração da presença do fluxo venoso na veia colônica pela Dopplermetria, o manguito foi inflado progressivamente. Ao verificar-se a obstrução do fluxo venoso, interrompeu-se imediatamente o inflamento do manguito, e a ausência de fluxo venoso e a presença de fluxo arterial foram confirmados em toda a extensão dos vasos colônicos instrumentados durante aproximadamente 1 minuto. Durante toda a fase de isquemia o segmento instrumentado permaneceu fora da cavidade abdominal (Figura 1). Para evitar o resfriamento e ressecamento do cólon, este foi mantido envolto em plástico, e a temperatura da superfície do intestino foi

¹EModelo EU 700 - Embracrios

monitorada e mantida acima de 32°C através da irrigação com solução de Ringer com lactato aquecida, quando necessário. A monitoração da ausência de fluxo venoso e da presença do fluxo arterial foi realizada a cada 15 minutos durante todo o período.

Após duas horas de isquemia o manguito foi desinflado e removido. Após a confirmação do retorno do fluxo venoso e da presença de fluxo arterial no segmento instrumentado, o cólon foi devolvido ao abdome, e após duas horas de reperfusão foi realizada a síntese da ferida cirúrgica, permitindo-se a recuperação da anestesia.

- TRATAMENTOS

Os tratamentos foram realizados após uma hora de isquemia e após seis horas de reperfusão nos animais dos três grupos experimentais, e foram administrados durante uma hora (Quadro 1).

Após uma hora de isquemia (1º tratamento), os equinos do Grupo Controle receberam infusão de 12,5mL/kg de solução de Ringer lactato (placebo), enquanto os equinos do Grupo Glutamina foram tratados com 25mg/Kg de glutamina¹ diluídos em 12,5mL/kg de solução de Ringer com lactato e os equinos do Grupo Associação receberam, sequencialmente, em *bolus* e por via intravenosa, 4mg/Kg de hidrocortisona², 10mg/Kg de pentoxifilina³, 50mg/Kg de ácido ascórbico⁴ e 20mg/Kg de dimetilsulfóxido⁵ diluídos em 100mL de solução salina, além de infusão de 12,5mL/kg de solução de Ringer lactato (placebo).

Após seis horas de reperfusão (2º tratamento) os equinos dos Grupos Controle e Associação receberam apenas infusão de 12,5mL/kg de solução de Ringer lactato (placebo), enquanto os equinos do Grupo Glutamina foram novamente tratados com 25mg/Kg de glutamina diluídos em 12,5mL/kg de solução de Ringer lactato.

¹L-Glutamina. Galena Química e Farmacêutica Ltda. Campinas, SP.

²Androcortil. Teuto Brasileiro S/A. Anápolis, GO.

³Pentox. Farmasa S/A. São Paulo, SP.

⁴Monovin C. Laboratório Bravet Ltda. Rio de Janeiro, RJ.

⁵Dimesol. Marcolab Indústria de Produtos Veterinários. Duque de Caxias, RJ

	Grupo Controle (C)	Grupo Glutamina (G)	Grupo Associação (A)
1º tratamento (1h isquemia)	Solução de Ringer lactato 12,5mL/kg durante 1h IV	Solução de Ringer lactato 12,5mL/kg durante 1h IV + 25mg/Kg L-glutamina IV	Solução de Ringer lactato 12,5mL/kg durante 1h IV + 4mg/Kg hidrocortisona IV 20mg/kg dimetilsulfóxido IV 50mg/Kg ácido ascórbico IV 10mg/kg pentoxifilina IV
2º tratamento (6h reperfusão)	Solução de Ringer lactato 12,5mL/kg durante 1h IV	Solução de Ringer lactato 12,5mL/kg durante 1h IV + 25mg/Kg L-glutamina IV	Solução de Ringer lactato 12,5mL/kg durante 1h IV

Quadro 1 - Tratamentos realizados nos equinos dos grupos experimentais – Betim – 2006/2007

- RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA, MANEJO PÓS-OPERATÓRIO E EUTANÁSIA DOS EQUINOS

Imediatamente antes do término da síntese do abdome os animais foram medicados com 0,05mg/kg IV de butorfanol¹ por via intravenosa. Após o término da cirurgia os equinos foram removidos para uma sala de recuperação anestésica, e ao deambularem foram levados para baias individuais. Durante o pós-operatório não foi fornecida alimentação ou água. Após quatro e oito horas do término da cirurgia os equinos receberam administrações adicionais de 0,05mg/kg IV de butorfanol. Decorridas 12 horas do início da reperfusão os equinos foram sedados com xilazina² (1mg/kg IV) e acepromazina³ (0,1mg/kg IV), e, em seguida, receberam tiopental⁴ por via intracarotídea (3mg/kg), sendo a seguir eutanasiados por meio da infusão intravenosa de solução saturada de sulfato de magnésio.

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

²/ Sedazine - Fort Dodge Animal Health Inc

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

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

- COLHEITA DAS AMOSTRAS

De cada eqüino foram colhidas na borda antimesentérica do intestino cinco amostras do cólon maior medindo aproximadamente 5 x 3cm (Quadro 2). As amostras colhidas no segmento experimental foram obtidas utilizando tesoura, a uma distância mínima de 5 centímetros da região de aplicação do manguito. Após a colheita das amostras o intestino foi suturado com fio catgut cromado nº 0 em padrão contínuo simples. Imediatamente antes do início da isquemia, foi colhida a primeira amostra (T0) em área adjacente ao segmento experimental, e após duas horas de isquemia (I2) e duas horas de reperfusão (R2) foram colhidas amostras diretamente no segmento experimental. Após a eutanásia, em no máximo 15 minutos após o óbito, foram colhidas as amostras correspondentes a 12 horas de reperfusão, sendo uma no segmento experimental (R12) e outra em uma região do cólon que não foi manipulada durante a cirurgia, localizada na transição entre os cólons maior e transversal (R12dist) (Quadro 2).

Após a colheita, as amostras de intestino foram delicadamente lavadas com solução de Ringer com lactato e fracionadas em três partes. Uma foi imediatamente fixada em formalina a 10% tamponada, para posterior processamento por técnicas rotineiras de inclusão em parafina, coloração pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) (LUNA, 1968) e análise histológica em microscópio de luz. O segundo fragmento foi fixado em solução de glutaraldeído tamponado e armazenado a 4°C, para posterior processamento de forma rotineira para microscopia eletrônica de varredura. O terceiro fragmento, destinado a análises de mieloperoxidase, foi acondicionado em tubos criogênicos e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido.

	Trans operatório			Após eutanásia
Momento da colheita	Pré isquemia (controle)	2h Isquemia	2h Reperfusão	12h Reperfusão
Local da colheita e codificação	Adjacente ao segmento experimental (T0)	No segmento experimental (I2)	No segmento experimental (R2)	No segmento experimental (R12) Na transição dos cólons maior e transverso (R12dist)

Quadro 2 - Caracterização e localização de colheitas de amostras dos grupos experimentais– Betim – 2006/2007

- **PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Em todas as amostras foi realizada avaliação histológica para examinar a presença de lesão na mucosa, a intensidade da hemorragia na mucosa, submucosa e muscular; a intensidade do edema na submucosa, e a presença de neutrófilos na mucosa, submucosa e muscular. Adicionalmente foi realizada avaliação ultra-estrutural da mucosa e determinação da atividade da mieloperoxidase.

- **Análises histológicas**

De cada amostra foram realizados cortes histológicos, sendo a seguir codificados e avaliados ao microscópio de luz quanto a parâmetros histomorfológicos, sem que houvesse conhecimento de sua identificação pelo examinador. Na avaliação levou-se em conta a extensão e a intensidade das alterações para quantificar, por meio de escores, a intensidade das alterações observadas para as diferentes variáveis estudadas. Quando houve dúvida quanto ao

escore que melhor traduziria o grau de lesão presente nas amostras, foram utilizados valores intermediários.

Na análise histopatológica dos intestinos foram utilizados como parâmetros semi-quantitativos os escores para lesão na mucosa; hemorragia nas camadas mucosa, submucosa e muscular; edema na submucosa e presença de neutrófilos na mucosa, submucosa e muscular, conforme sistema adotado por FALEIROS (2003) (Quadros 3, 4 e 5) (Figura 2).

(escore) Grau da lesão	Características histopatológicas
0 – Ausente	Normal. As células do epitélio luminal e das glândulas se apresentam bem aderidas à lâmina própria
1 – Discreto	Presença de vacúolos intracitoplasmáticos e de espaços entre as células do epitélio luminal. Início da separação entre as células do epitélio luminal e a lâmina própria.
2 – Leve	A camada de células do epitélio luminal se apresenta interrompida. Presença de células com diâmetro menor, de coloração mais intensa e núcleos picnóticos.
3 – Intermediário	Desprendimento do epitélio luminal com exposição da lâmina própria. Início de degeneração e desprendimento das células do epitélio das criptas.
4 – moderado	Desprendimento de aproximadamente 50% do epitélio das criptas. Início de degeneração e necrose da lâmina própria.
5 – severo	Desprendimento profundo do epitélio das criptas, com pequena ou nenhuma preservação. Degeneração e necrose progressivas da lâmina própria.

Quadro 3 - Caracterização dos escores para lesão na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, modificado de FALEIROS (2003)

(escore) Grau da lesão	Características histopatológicas
0 - ausente	Ausente
1 - discreto	Presença de neutrófilos observada após exame minucioso ou marginação intravascular facilmente observada sem infiltração extravascular.
2 - leve	Presença de neutrófilos extravasculares em número reduzido.
3 - moderado	Presença de neutrófilos extravasculares em maior número, porém localizada.
4 - severo	Presença difusa de neutrófilos em toda a estrutura

Quadro 4 - Caracterização dos escores para presença de neutrófilos no cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, modificado de FALEIROS (2003)

(escore) Grau da lesão	Características histopatológicas
0 - ausente	Ausente
1 - discreto	Observado após exame minucioso.
2 - leve	Facilmente observado, mas não extenso.
3 - moderado	Extenso, mas sem distorção das estruturas
4 - severo	Extenso e com distorção das estruturas.

Quadro 5 - Caracterização dos escores para edema e hemorragia no cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, modificado de FALEIROS (2003)

Figura 2 - Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE, mostrando a caracterização dos escores para lesão na mucosa (A, B, C, D e E Ob. 10x). A) escore 0 (ausente). As células do epitélio e das glândulas se encontram bem aderidas à lâmina própria. B) escore 1 (discreto). Presença de vacúolos intracitoplasmáticos e de espaços entre as células do epitélio (setas). C) escore 2 (leve). A camada de células do epitélio luminal se encontra rompida (seta). D) escore 3 (intermediário). Desprendimento do epitélio luminal com exposição da lâmina própria (setas). E) escore 4 (moderado) Desprendimento de aproximadamente 50% do epitélio das criptas e início de necrose da lâmina própria— Betim – 2006/2007

- **Análise ultra-estrutural**

Para a análise ultra-estrutural as amostras de cólon foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 16mm² e os fragmentos foram tratados com tetróxido de ósmio a 2% por duas horas. Em seguida os fragmentos foram desidratados por meio de passagens sucessivas de 15 minutos em concentrações crescentes de álcool etílico e secados em CO₂ sob pressão em secador de ponto crítico. Após, foram metalizados em metalizador de fluxo iônico por 70 segundos a 70mA.

A superfície da mucosa foi examinada em microscópio eletrônico de varredura a 15Kv em aumento de 150 vezes e fotografada. As imagens obtidas foram avaliadas quanto a possíveis alterações morfológicas com o objetivo de complementar a avaliação da mucosa realizada por meio da microscopia de luz.

- **Avaliação da atividade de mieloperoxidase**

A determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) foi realizada conforme protocolo descrito por Souza et al. (2000). Após descongelamento, 100mg de tecido foram triturados e homogeneizados em 1,9mL de solução tampão com pH 4,7 (0,1M de NaCl, 0,02M de NaPO₄ e 0,015M de NaEDTA). O material obtido foi centrifugado a 260 x g por 10 minutos, e após a eliminação do sobrenadante, realizou-se a lise hipotônica, com 1,5mL de solução de NaCl a 0,2% por 30 segundos. Em seguida a solução foi adicionada de solução com 1,6% de NaCl e 5% de glicose e novamente centrifugada, após o que foram realizadas ressuspensão e homogeneização com tampão de NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de bromido de hexadecil-trimetil-amônia. Dessa solução, alíquotas de 1mL foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido. Após 10 minutos de centrifugação a 10.000 x g, a retirada do sobrenadante e a ressuspensão em 1mL, determinou-se a atividade da MPO medindo-se a mudança na densidade ótica a 450nm, utilizando tetrametilbenzidina

(1,6mM) e peróxido de hidrogênio (0,5mM). Os resultados foram obtidos pela média dos valores de duas análises de cada amostra.

- **Tratamento estatístico dos dados**

Foram realizadas comparações específicas entre os diferentes tempos em cada grupo e entre os grupos em cada tempo. As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância aleatória para comparação entre grupos e em blocos ao acaso para comparação entre tempos, ambas seguidas pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre as médias. As variáveis não paramétricas foram analisadas segundo o teste de Friedman para tempos em um mesmo grupo e segundo o teste de Kruskal-Wallis para grupos em um mesmo tempo, ambos seguidos pelo teste de Dunn para comparação entre as médias (SAMPAIO, 1998). Foi considerado o nível de significância de $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

- ANESTESIA

Após a administração de midazolam e EGG todos os equinos atingiram o decúbito de forma tranquila e sem excitações. O relaxamento produzido foi satisfatório, tendo sido intubados todos os equinos em, no máximo, duas tentativas. Durante toda a fase de isquemia os critérios mínimos estabelecidos para oximetria, capnografia e pressão arterial foram atingidos sem dificuldade, entretanto após o restabelecimento circulatório nos segmentos experimentais verificou-se deterioração dos parâmetros avaliados, sendo necessária a infusão de dobutamina em todos os equinos e a utilização de ventilação controlada nos equinos 7, 5, 8, 15, 9, 6 e 11. A recuperação anestésica ocorreu de forma satisfatória em todos os animais, não havendo a necessidade da administração de nenhum outro fármaco além dos previstos.

- MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Antes do início da isquemia, os fluxos arterial e venoso foram facilmente detectados em todos os animais. Após a insuflação do manguito, não houve dificuldade em identificar a interrupção da circulação venosa, bem como a manutenção do fluxo arterial nos segmentos experimentais. Eventualmente, ao iniciar a fase de isquemia, nos casos em que a pressão fornecida ao manguito foi excessiva, houve obstrução simultânea da circulação venosa e arterial, entretanto essa condição foi prontamente detectada e corrigida por meio da monitoração através do Doppler. Nesses casos o manguito foi desinflado até verificar-se o retorno da circulação arterial e em seguida aumentou-se novamente a pressão

progressivamente até constatar-se a interrupção apenas da circulação venosa e a permanência do fluxo arterial.

Durante a fase de isquemia, foram observadas alterações macroscópicas que se agravaram durante a reperfusão nos segmentos experimentais. Imediatamente após o inflamento do manguito foi possível notar a ocorrência de distensão e escurecimento das veias colônicas murais e do mesocólon. Com a evolução da isquemia, observou-se progressivo espessamento da parede do intestino e do mesocólon (Figura 3), bem como a ocorrência de petéquias na serosa, que também se mostraram mais intensas conforme a evolução da isquemia. Após a retirada do manguito e o início da reperfusão, verificou-se um imediato retorno da circulação venosa nos segmentos experimentais em todos os equinos, bem como a redução na congestão das veias colônicas, retornando os segmentos experimentais a uma coloração mais clara, assemelhando-se às áreas não instrumentadas do cólon. As petéquias observadas na serosa bem como a intensidade do espessamento mural e do mesocólon mantiveram-se inalterados durante a reperfusão (Figura 4). Não foram detectadas diferenças na natureza, intensidade ou distribuição das alterações observadas nos segmentos experimentais entre os animais dos diferentes grupos experimentais.

- PÓS OPERATÓRIO

Durante o pós-operatório os animais permaneceram em estação, entretanto mantiveram-se apáticos. Os animais 1, 6, 7, 9 e 16 apresentaram sinais de abdome agudo de intensidade leve a moderada, que reduziram com as administrações programadas de butorfanol.

Figura 3 - Cólon maior do equino experimental nº 17 após duas horas de isquemia. A) Espessamento do intestino e do mesocólon. B) Edema do mesocólon e ingurgitamento dos vasos murais – Betim – 2006/2007

Figura 4 - Cólon maior do equino experimental nº 19 após duas horas de isquemia e duas horas de reperfusão. A) intenso edema na submucosa B) detalhe da amostra evidenciando hiperemia da mucosa e serosa e intenso edema da submucosa – Betim – 2006/2007

- NECROPSIA

Ao final do período de reperfusão os equinos foram submetidos a eutanásia, e ao realizar-se a abertura do abdome foi achado comum a ocorrência de quantidade moderada de líquido sero-sanguinolento na cavidade, bem como a presença de fibrina livre na cavidade e coágulos sanguíneos aderidos à serosa do intestino. Ao exame dos segmentos experimentais, observou-se espessamento da parede do cólon

e edema no mesocólon, além da presença difusa de petéquias em toda a superfície dos segmentos experimentais. Não foi observado extravasamento de conteúdo intestinal em nenhum dos locais de colheita de amostras ou diferenças entre as características macroscópicas observadas nos animais dos diferentes grupos experimentais.

- EXAME DAS AMOSTRAS

- **Análises histológicas**

- Lesão na mucosa

Os escores para lesão na mucosa nas amostras T0 foram iguais a 0 nos equinos dos três grupos experimentais (Tabela 2) (Gráfico 1). Após duas horas de isquemia, verificou-se aumento nos escores dos animais dos Grupos C, A e G, mas esses foram equivalentes aos escores basais. Durante a reperfusão, após duas horas constatou-se aumento significativo ($p < 0,05$) na lesão na mucosa nos três grupos experimentais, sendo que após doze horas verificou-se redução nos escores e sua equivalência com as amostras controle. Durante toda a evolução da isquemia e da reperfusão, e também nas amostras R12 dist, a intensidade da lesão na mucosa foi equivalente entre os grupos experimentais.

Tabela 2 - Escores médios e desvios padrão para presença de lesão na mucosa do cólon maior dos equinos dos grupos experimentais – Betim – 2006/2007

		CONTROLE	ASSOCIAÇÃO	GLUTAMINA
Lesão na mucosa	T0 ¹	0,00 ± 0,00 a A ³	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	0,70 ± 0,82 a AB	1,33 ± 0,60 a AB	1,08 ± 0,70 a AB
	R2 ²	1,60 ± 0,80 a B	1,67 ± 1,01 a B	1,67 ± 0,61 a B
	R12 ²	1,25 ± 0,99 a AB	1,25 ± 0,61 a AB	1,33 ± 0,41 a AB
	R12 dist ²	0.33 ± 0.52 a AB	0.42 ± 0,49 a AB	0,83 ± 0,41 a AB

¹T0: Pré-isquemia, I2: Isquemia 2h.

²R2: Reperusão 2h; R12: Reperusão 12h; R12 dist: Reperusão 12h à distância.

³Para cada variável, letras minúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Valores seguidos de pelo menos uma letra igual são equivalentes entre si (p<0,05).

Gráfico 1 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de lesão na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si (p < 0,05). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si (p < 0,05) – Betim – 2006/2007

- Hemorragia

Na mucosa, a presença de hemorragia foi verificada após duas horas de isquemia nos Grupos C, A e G (Figura 5), e seu aumento foi significativo ($p < 0,05$) nos Grupos A e G (Tabela 3) (Gráfico 2). No Grupo C, os escores foram significativamente mais altos após duas horas de reperfusão quando comparados às amostras colhidas em T0 ($p < 0,05$). A intensidade da hemorragia na mucosa foi equivalente entre os grupos experimentais em todos os tempos de colheita.

Na submucosa, também ocorreu a presença de hemorragia após duas horas de isquemia nos três grupos (Figura 5) (Gráfico 3) entretanto essa foi significativa apenas após duas horas de reperfusão nos grupos C e A e após doze horas de reperfusão no Grupo G ($p < 0,05$) (Tabela 3). Não foi verificada hemorragia nos tempos T0 e R12 dist. Na comparação entre grupos, os resultados foram semelhantes em todos os momentos de colheita.

Na camada muscular, a presença de hemorragia foi menos intensa que nas camadas mucosa e submucosa (Tabela 3) (Gráfico 4). Sua presença foi verificada nos amostras I2, R2 e R12, entretanto os escores permaneceram equivalentes para essa variável em todos os tempos de colheita. Nas amostras R12dist não foi detectada a presença de hemorragia em nenhum dos grupos. Comparando-se os grupos, os resultados foram equivalentes em todos os tempos.

- Edema

A presença de edema na submucosa foi expressiva após duas horas de isquemia (Figura 6), sendo significativamente maior que em T0 nos três grupos experimentais (Tabela 3) (Gráfico 5). Durante a reperfusão os escores permaneceram equivalentes entre os tempos I2, R2 e R12, e os escores nas amostras R12dist foram iguais a 0. Na comparação entre grupos, os resultados foram equivalentes em todos os tempos de colheita de amostras.

- Presença de neutrófilos

Após a isquemia e durante a reperfusão, os escores para presença de neutrófilos na mucosa aumentaram em todos os grupos (Gráfico 6), entretanto esse aumento foi leve e não significativo em nenhum dos grupos. Na comparação entre grupos os escores foram equivalentes em todos os tempos.

Na submucosa, também verificou-se aumento dos escores para presença de neutrófilos em todos os grupos, e esse também foi leve (Figura 7) (Gráfico 7), sendo significativo apenas nas amostras colhidas após duas horas de isquemia no Grupo A ($P < 0,05$).

Na muscular a presença de neutrófilos seguiu o mesmo padrão verificado na mucosa, não tendo havido diferenças significativas nos grupos nas comparações entre tempos de colheita ou entre grupos (Gráfico 8)

Gráfico 2 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de hemorragia na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

Tabela 3 - Escores médios e desvios padrão para presença de neutrófilos, de hemorragia e de edema no cólon maior dos equinos dos grupos experimentais – Betim – 2006/2007

		CONTROLE	ASSOCIAÇÃO	GLUTAMINA
Hemorragia na mucosa	O ¹	0,00 ± 0,00 a A ³	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	2,17 ± 0,41 a AB	2,58 ± 0,58 a B	2,25 ± 0,69 a B
	R2 ²	2,33 ± 0,61 a B	2,50 ± 0,63 a B	1,92 ± 1,20 a AB
	R12 ²	1,58 ± 1,11 a AB	2,08 ± 0,49 a AB	2,17 ± 0,61 a AB
	R12 dist ²	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
Hemorragia na submucosa	O ¹	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	1,50 ± 0,77 a AB	2,25 ± 0,42 a AB	1,58 ± 0,86 a AB
	R2 ²	1,75 ± 0,42 a B	2,42 ± 0,58 a B	1,83 ± 0,68 a AB
	R12 ²	1,33 ± 0,82 a AB	2,50 ± 0,89 a B	2,08 ± 1,11 a B
	R12 dist ²	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
Hemorragia na muscular	O ¹	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	0,17 ± 0,41 a A	1,00 ± 0,84 a A	0,33 ± 0,82 a A
	R2 ²	0,25 ± 0,61 a A	0,50 ± 0,77 a A	0,42 ± 0,66 a A
	R12 ²	0,25 ± 0,61 a A	0,83 ± 0,68 a A	0,17 ± 0,41 a A
	R12 dist ²	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
Edema na submucosa	O ¹	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	2,50 ± 0,45 a B	3,08 ± 0,80 a B	2,92 ± 0,49 a B
	R2 ²	3,08 ± 0,74 a B	3,50 ± 0,63 a B	3,17 ± 0,61 a B
	R12 ²	1,92 ± 0,74 a AB	2,92 ± 1,07 a AB	2,67 ± 0,98 a AB
	R12 dist ²	0,33 ± 0,82 a AB	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
Neutrófilos na mucosa	O ¹	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	0,17 ± 0,41 a A	1,08 ± 0,58 a A	0,83 ± 0,68 a A
	R2 ²	0,33 ± 0,52 a A	1,08 ± 0,92 a A	1,08 ± 1,11 a A
	R12 ²	0,00 ± 0,00 a A	1,00 ± 0,84 a A	1,00 ± 0,55 a A
	R12 dist ²	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,33 ± 0,52 a A
Neutrófilos na submucosa	O ¹	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2h ¹	0,50 ± 0,55 a A	1,50 ± 0,45 a B	1,00 ± 0,89 a A
	R2 ²	0,17 ± 0,41 a A	0,17 ± 0,41 a AB	0,83 ± 0,69 a A
	R12 ²	0,00 ± 0,00 a A	0,42 ± 0,66 a AB	0,50 ± 0,84 a A
	R12 dist ²	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
Neutrófilos na muscular	T0 ¹	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A
	I2 ¹	0,17 ± 0,41 a A	0,75 ± 0,89 a A	0,58 ± 0,66 a A
	R2 ²	0,42 ± 0,68 a A	0,17 ± 0,41 a A	1,00 ± 0,84 a A
	R12 ²	0,75 ± 0,82 a A	1,00 ± 0,84 a A	0,58 ± 0,66 a A
	R12 dist ²	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A	0,00 ± 0,00 a A

¹T0: Pré-isquemia, I2: Isquemia 2h.

²R2: Reperusão 2h; R12: Reperusão 12h; R12 dist: Reperusão 12h à distância.

³Para cada variável, letras minúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Valores seguidos de pelo menos uma letra igual são equivalentes entre si (p<0,05).

Figura 5 - Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE, evidenciando o padrão de hemorragia na mucosa e na submucosa durante as fases de isquemia e de reperfusão (A, B e C Ob. 4x). A) após duas horas de isquemia (equino nº 10). Hemorragia extensa nas camadas mucosa (setas menores) e submucosa (setas maiores), correspondendo em ambas ao escore 3. B) após duas horas de reperfusão (equino nº 18). Presença de hemorragia severa na mucosa e submucosa, correspondendo ao escore 4 em ambas as camadas. C) Após doze horas de reperfusão (equino nº 16). Hemorragia extensa na mucosa (setas menores) correspondendo ao escore 3, e facilmente observada na submucosa (setas maiores), correspondendo ao escore 2 – Betim – 2006/2007

Gráfico 3 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de hemorragia na submucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

Gráfico 4 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de hemorragia na muscular do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

Figura 6 - Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE., evidenciando o edema na submucosa (A e B Ob. 4x). A) pré-isquemia (equino n° 9). Ausência de edema na submucosa (seta) correspondendo ao escore 0 (ausente). B) após duas horas de reperfusão (equino n° 15). Congestão de vasos da submucosa (setas menores) e presença de severo edema na submucosa (seta maior), correspondendo ao escore 4 – Betim – 2006/2007

Gráfico 5 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de edema na submucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

Gráfico 6 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de neutrófilos na mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

Figura 7 - Fotomicrografias do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão, corado pela HE, evidenciando a presença de neutrófilos e eosinófilos na submucosa durante a reperfusão. A) após duas horas de reperfusão (Ob 100x, equino nº 6). Marginação de neutrófilos em vasos da submucosa (setas), correspondendo ao escore 1, e presença de eosinófilos no tecido (setas menores) B) após doze horas de reperfusão (Ob 40x, equino nº 16). Ausência de neutrófilos extravasculares e em vaso da submucosa (seta), correspondendo ao escore 0 – Betim – 2006/2007

Gráfico 7 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de neutrófilos na submucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

Gráfico 8 - Médias e erros padrão da média dos escores para presença de neutrófilos na muscular do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) – Betim – 2006/2007

- **Análise ultra-estrutural**

A análise das imagens obtidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitou acompanhar a evolução das alterações produzidas no cólon durante a isquemia e reperfusão. Nas amostras colhidas no tempo T0, a superfície da mucosa apresentou depressões bem marcadas, além de aspecto enrugado e abertura das criptas evidente (Figura 8, A e B). Após duas horas de isquemia a mucosa passou a apresentar aspecto liso, tornando-se difícil a visualização da abertura das criptas, sendo que em algumas das amostras foi possível visualizar áreas com aspecto de fissuras superficiais na mucosa (Figura 9, A). Depois de duas horas de reperfusão, essas fissuras tornaram-se mais evidentes, sendo possível visualizar amplas áreas de exposição da lâmina própria em algumas amostras (Figura 9, B). Após doze horas de reperfusão, a reparação do epitélio foi completa na maioria das imagens avaliadas; entretanto, a mucosa não retornou ao aspecto normal, sendo possível observar em algumas amostras a presença de fissuras profundas na mucosa (Figura 10, A). Nas amostras colhidas à distância dos segmentos experimentais após 12 horas de reperfusão, a mucosa apresentou um aspecto ‘‘edemaciado’’, em contraste com o aspecto rugoso das amostras colhidas em T0, dificultando a visualização da abertura das criptas (Figura 10, B).

Em grande parte das amostras verificou-se a presença de material amorfo cobrindo grande parte da mucosa, o que dificultou a avaliação dessas imagens (Figura 11).

Figura 8 - Características da mucosa normal do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x). Amostras pré-isquemia (T0). A (equino nº 5) e B (equino nº 4) – Observa-se aspecto enrugado da mucosa (setas menores) e abertura das criptas de fácil identificação (setas maiores) – Betim – 2006/2007

Figura 9 – Características da mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x). A) Após duas horas de isquemia, a mucosa apresenta aspecto liso difuso e áreas de descontinuidade no epitélio (setas) (eqüino nº15). B) Após duas horas de reperfusão observam-se áreas maiores de descontinuidade no epitélio (setas maiores) e extensa área de exposição profunda da lâmina própria (setas menores) (eqüino nº13) – Betim – 2006/2007

Figura 10 – Características da mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x), após doze horas de reperfusão. A) A cobertura epitelial encontra-se reparada, porém a mucosa apresenta fissuras profundas (setas) (equino nº1). B) No cólon à distância, a mucosa exibe aspecto “edemaciado” difuso, dificultando a identificação da abertura das criptas (setas) (equino nº17) – Betim – 2006/2007

Figura 11 - Características da mucosa do cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperfusão avaliada pela microscopia eletrônica de varredura (15kV, 150x). A) após duas horas de isquemia (eqüino n°14) e B) após duas horas de reperfusão à distância (eqüino n°11). Presença de muco sobre grande parte da mucosa (setas), impedindo sua visualização – Betim – 2006/2007

○ **Análise da atividade de mieloperoxidase**

Os resultados para atividade de MPO foram equivalentes em todos os grupos entre as amostras controle e aquelas colhidas nos segmentos submetidos a isquemia e reperfusão (Tabela 4) (Gráfico 9). No Grupo C verificou-se redução significativa da atividade de MPO entre T0 e R12 dist ($p < 0,05$), enquanto que nos Grupos A e G houve redução significativa entre R2 e R12 dist ($p < 0,05$). Os resultados foram equivalentes na comparação entre grupos em todos os tempos de colheita.

Tabela 4 - Escores médios e desvios padrão para atividade de mieloperoxidase no cólon maior dos equinos dos grupos experimentais nos diferentes momentos – Betim – 2006/2007

		CONTROLE	ASSOCIAÇÃO	GLUTAMINA
Atividade de mieloperoxidase (absorvância/100mg tecido)	T0 ¹	0,48 ± 0,40 a ^{B 3}	0,30 ± 0,25 a ^{AB}	0,33 ± 0,16 a ^{AB}
	I2 ¹	0,23 ± 0,20 a ^{AB}	0,16 ± 0,11 a ^{AB}	0,18 ± 0,02 a ^{AB}
	R2 ²	0,18 ± 0,11 a ^{AB}	0,31 ± 0,08 a ^B	0,39 ± 0,16 a ^B
	R12 ²	0,10 ± 0,16 a ^{AB}	0,15 ± 0,21 a ^{AB}	0,14 ± 0,30 a ^{AB}
	R12 dist ²	0,02 ± 0,02 a ^A	0,03 ± 0,01 a ^A	0,03 ± 0,02 a ^A

¹T0: Pré-isquemia, I2: Isquemia 2h.

²R2: Reperusão 2h; R12: Reperusão 12h; R12 dist: Reperusão 12h à distância.

³Para cada variável, letras minúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Valores seguidos de pelo menos uma letra igual são equivalentes entre si (p<0,05).

Gráfico 9 - Médias e erros padrão da média dos escores para a atividade de mieloperoxidase no cólon maior de equinos submetidos a isquemia e reperusão. A) Comparação entre os resultados obtidos em cada tempo nos grupos experimentais controle, associação e glutamina. Em um mesmo grupo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si (p < 0,05). B) Comparação entre os resultados obtidos em cada grupo experimental nos tempos 0, I2, R2, R12 e R12 dist. Em um mesmo tempo, barras seguidas de letras iguais não diferem entre si (p < 0,05) – Betim – 2006/2007

6 DISCUSSÃO

- ANESTESIA

A associação de midazolam e éter gliceril guaiacol foi utilizada pois ambos provocam poucas alterações nos sistemas respiratório e circulatório (BROWNLOWN; HUTCHINS, 1991; MUIR, 2009a; MUIR, 2009b). O objetivo principal da utilização do midazolam foi de potencializar a anestesia geral, mas provavelmente também facilitou o decúbito e a intubação, devido ao seu efeito miorrelaxante (LUNA et al, 1997). Sua administração foi realizada imediatamente antes da indução do decúbito para evitar a ocorrência de ataxia e dificuldades no manejo pré-anestésico. A administração de éter gliceril guaiacol permitiu a indução do decúbito e a intubação orotraqueal de forma tranquila e controlada. A diminuição da oximetria e pressão arterial verificados após o restabelecimento circulatório no intestino provavelmente foram devidos à chegada na circulação sistêmica de mediadores inflamatórios produzidos em decorrência da isquemia e reperfusão intestinal e de endotoxinas absorvidas devido à lesão na mucosa e exposição de vasos da lâmina própria (WHITE, 1999). A administração de dobutamina e a ventilação controlada foram eficientes em manter os parâmetros mínimos para pressão arterial e oximetria exigidos até o final da anestesia.

- PÓS OPERATÓRIO

Os sintomas de dor pós-operatória verificados nos equinos 1, 6, 7, 9 e 16 podem ter resultado das lesões murais produzidas durante a isquemia e reperfusão, de espasmo intestinal decorrente do trauma cirúrgico ou inflamação do peritônio, e sinais de desconforto abdominal no período pós-operatório já foram relatados em equinos submetidos a IR experimental no cólon maior (MATYJASZEK et al., 2009). A

possibilidade de distensão intestinal também poderia ser considerada, entretanto à necropsia essa não foi verificada em nenhum dos animais.

Não foram utilizados antiinflamatórios não esteróides no presente estudo devido á possibilidade de interferência na inflamação e reparação da mucosa (HIGGINS; LEES, 1984, ZIMMEL, BLIKSLAGER, 1998, COOK et al., 2008), optando-se por empregar o butorfanol para esse fim. A dose utilizada no presente estudo proporciona analgesia durante quatro horas (KALPRAVIDH et al., 1984) e não produz alterações cardiovasculares ou respiratórias relevantes (ROBERTSON et al., 1981), sendo que Stick et al. (1989) demonstraram que doses mais elevadas que as utilizadas no presente estudo não afetam a resistência vascular ou a atividade metabólica do intestino de equinos.

- **MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

O presente estudo empregou um modelo inédito de isquemia no cólon utilizando braçadeira de esfigmomanômetro e manguito, idealizado para permitir a realização de isquemia venosa

O modelo de isquemia mais utilizado nos estudos de IR no cólon maior é o de baixo fluxo, em que a artéria colônica é dissecada e ao seu redor é posicionada uma fita umbilical na forma de torniquete de Rummel, sendo a fita tensionada sob monitoramento contínuo do fluxo arterial através de um sensor Doppler de fluxo ultrassônico, até que o fluxo arterial seja reduzido a 20% do fluxo basal (MOORE et al., 1994a, MOORE et al., 1998). Esse modelo de IR possui vantagens para a realização de estudos acerca da fisiopatologia da IR no cólon. Entretanto, esse não nos pareceu o modelo mais adequado para realizar um estudo sobre a terapêutica da IR, tendo em vista que Snyder et al., (1988), White, (1999), Blikslager, (2006) e Soffler, (2007) consideraram que o modelo de obstrução venosa é o que produz alterações que mais se assemelham àquelas verificadas na rotina clínico cirúrgica de pacientes com abdome agudo. Moore et al (1995a) verificaram a ocorrência de hiperemia reativa no cólon após isquemia de baixo fluxo, com aumento de 242% no

fluxo sanguíneo para a mucosa e de 327% para a camada seromuscular, em contraste com estudos que demonstraram que, ao contrário, a perfusão intestinal mantém-se menor que a basal no período pós-isquêmico após torção intestinal (PROVOST et al., 1991; Wilkins et al, 1994).

O modelo de isquemia venosa no cólon maior foi utilizado por Snyder et al (1988) em três equinos utilizando clamps vasculares nas veias colônicas, entretanto, considerou-se que o espasmo vascular frequentemente observado após a retirada dos clamps poderia interferir no restabelecimento circulatório, contribuindo para a progressão das lesões durante a fase de reperfusão, além da possibilidade de ocorrência de trombose e obstrução vascular em decorrência da lesão tecidual excessiva.

O emprego de drenos de Penrose para a realização das ligaduras venosas permite minimizar o espasmo vascular pós-isquêmico e essa metodologia têm sido utilizada com sucesso em estudos de IR no intestino delgado (RIO TINTO, 1999, ABREU, 2003, PAGLIOSA, 2009), entretanto sua utilização não foi possível neste estudo. Em um animal utilizado para testar a metodologia inicialmente proposta para este estudo, foi realizada tentativa de produzir a isquemia venosa através da dissecação e ligadura das veias colônicas do segmento experimental utilizando drenos de Penrose, acompanhada do bloqueio da circulação mural por meio de ligaduras ao redor da alça intestinal utilizando o mesmo tipo de dreno, entretanto, a dissecação mostrou-se extremamente difícil entre a parede intestinal e os vasos colônicos, devido à presença de grande quantidade de tecido adiposo perivascular dificultando a evidenciação dos vasos, além do grande número de anastomoses entre as veias curtas procedentes da parede intestinal e as veias colônicas principais, ocorrendo a presença de hematomas em todas as tentativas de dissecação realizadas.

Para contornar esse obstáculo foi concebida a instrumentação empregada no presente estudo, com a utilização de uma braçadeira de esfigmomanômetro para permitir a compressão progressiva e controlada dos vasos colônicos e da parede intestinal, permitindo a obstrução do fluxo venoso sem a interrupção do fluxo arterial. A utilização da Dopplermetria de fluxo permitiu avaliar criteriosamente a ausência do fluxo venoso e a manutenção do fluxo arterial durante as fases de

isquemia e de reperfusão. A pressão do manguito foi medida continuamente, entretanto essa não foi padronizada entre os equinos experimentais uma vez que foi observada variação entre os equinos na pressão necessária para produzir a obstrução venosa, na dependência de pequenos ajustes na posição do manguito, e considerou-se que a avaliação da eficácia da obstrução deveria ser baseada apenas na identificação da presença ou ausência do fluxo sanguíneo pela Dopplermetria. Apesar de terem sido realizados quando necessário, foi incomum a necessidade de ajustes na distensão do manguito durante as duas horas de isquemia.

A metodologia empregada permitiu o desenvolvimento de lesões no cólon semelhantes às descritas na literatura após isquemia experimental (SNYDER et al., 1988; WILSON, 1994), e também às observadas em casos de enfermidades acompanhadas de isquemia no cólon de menor gravidade (WHITE, 1999; BLIKSLAGER, 2006). Além disso, permitiu a evidência da lesão de reperfusão, uma vez que o aumento dos escores para lesão na mucosa, apesar de ocorrer após duas horas de isquemia, foi significativo apenas após duas horas de reperfusão.

- ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A avaliação das alterações histológicas utilizando o método de escores foi satisfatória, visto que os resultados obtidos foram compatíveis com o de outros estudos onde foi empregada metodologia semelhante (WHITE et al., 1980; FREEMAN et al., 1988b; HORNE et al., 1994). Nesses estudos foram utilizados apenas escores inteiros para expressar a intensidade das alterações observadas, entretanto a utilização de escores fracionados no presente estudo provavelmente permitiu aumentar a sensibilidade da avaliação histológica, potencialmente minimizando o erro experimental.

Durante a avaliação preliminar das amostras foi observado que a presença de hemorragia extensa em muitas das amostras impedia a correta avaliação da presença de edema nessa camada do intestino e por isso essa alteração não foi avaliada. Adicionalmente, a presença de edema na camada muscular foi dificultada

pela presença de artefatos em algumas amostras, e como a presença de alterações nessa camada é leve durante a IR (MESCHTER et al., 1986; VERASTEGUI, 1995; RIO TINTO, 1999) optou-se por também não avaliar sua alteração.

A IR produz alterações expressivas na serosa do intestino (LUNDIN et al., 1989; DABAREINER et al., 2001; FALEIROS, 2003), entretanto essa não foi avaliada no presente estudo pois considerou-se que o delineamento proposto não é adequado para avaliar tais alterações. A exposição da serosa e a instrumentação frequente do intestino ao longo do experimento poderiam produzir alterações que se somariam às decorrentes da IR (SULLINS, 1990). Para avaliar os efeitos da IR no intestino seria mais apropriado um delineamento em que a exposição da serosa fosse reduzida, para minimizar o trauma cirúrgico.

- **Lesão na mucosa**

Ao final da isquemia os escores para lesão na mucosa se elevaram em todos os grupos, e durante a reperfusão esses aumentaram significativamente, evidenciando a ocorrência da lesão de reperfusão. Esses achados demonstram a eficiência do modelo de isquemia empregado em produzir lesões na mucosa de forma semelhante à observada por outros autores em estudos empregando modelos de ISQ-V no cólon maior (SNYDER et al., 1988, REEVES et al., 1990), permitindo validar a metodologia empregada neste estudo para utilização em experimentos futuros.

Nas amostras colhidas à distância, observou-se aumento discreto nos escores para lesão na mucosa, mas esses não foram significativos. Já foi demonstrado em equinos portadores de abdome agudo que é comum a ocorrência de lesões à distância no intestino após IR no intestino, como resultado da hipoperfusão e endotoxemia (BLIKSLAGER, 2006; WHITE, 1999). Possivelmente o suporte de fluidoterapia e vasopressores empregado durante a anestesia e a administração de fluido realizada após seis horas de reperfusão possam ter contribuído para minimizar esse efeito. Além disso, a ocorrência de lesões remotas no intestino após IR tem sido

relatada principalmente no jejuno (PAGLIOSA, 2009), e como o cólon é mais resistente aos efeitos da IR pela ausência de vilosidades (SNYDER et al., 1988), possivelmente as lesões produzidas não foram suficientemente intensas para desencadear lesões à distância.

- **Hemorragia e edema**

As alterações mais intensas observadas ao exame histológico foram a hemorragia nas camadas mucosa e submucosa e o edema na submucosa. Os altos escores para hemorragia e edema observados são comuns após IR experimental no cólon maior quando é empregado o modelo de ISQ-V, e os resultados obtidos estão em concordância com os de outros estudos em que esse modelo foi utilizado (SNYDER et al., 1988, REEVES et al, 1990). Possivelmente, a expressiva hemorragia e edema decorreram do intenso aumento na pressão hidrostática na vasculatura local produzida pela obstrução venosa, somados aos potenciais efeitos dos RLOs e dos neutrófilos na microvasculatura. Analisando os escores para hemorragia e edema nas diferentes camadas do intestino não foi evidenciado nenhum efeito benéfico dos tratamentos realizados nos grupos A e G.

- **Presença de neutrófilos**

O aumento dos escores para presença de neutrófilos foi verificado nas três camadas do intestino estudadas durante a isquemia e a reperfusão, entretanto esse foi no máximo leve, sendo significativamente maior que o basal apenas no Grupo A no tempo I2. Esses resultados estão em concordância com os achados de Wilson et al. (1994) e Law; Freeman, (1995) que verificaram acúmulo de neutrófilos leve no cólon maior após uma hora de isquemia e cinco horas de reperfusão e de Alves et al. (2003) que verificaram leve aumento na presença de neutrófilos na mucosa e

submucosa do jejuno após duas horas de isquemia e duas horas de reperfusão. A importância dos neutrófilos na fisiopatologia da IR ainda não está estabelecida. Apesar de Moore et al., (1994a) terem demonstrado o acúmulo de neutrófilos no cólon submetido a IR, esses consideraram que não foi possível determinar se o aumento na quantidade de neutrófilos no tecido produziu o agravamento da lesão no cólon ou se foi apenas resultado da quimiotaxia determinada pela ação de mediadores da inflamação. Além disso, considera-se que os neutrófilos residentes possuem maior importância na produção de lesões teciduais (KUBES et al., 1992), e Van Hoogmoed et al. (2001a), utilizando perfusão extra-corpórea do jejuno, verificou que a eliminação dos neutrófilos circulantes por meio de filtração não atenuou as lesões decorrentes de IR.

O aumento significativo verificado após duas horas de isquemia no Grupo A, em primeira análise pode parecer paradoxal, uma vez que segundo McDonald, (1992) e Goldfien, (1994) o efeito esperado da hidrocortisona presente na associação seria de reduzir a quimiotaxia através do bloqueio da produção de eicosanóides e reduzir sua diapedese. Entretanto, Morris et al. (1988) demonstraram que a migração estimulada de neutrófilos é exacerbada pela hidrocortisona. Além disso, em ratos e camundongos a prostaglandina D₂ gerada pela ciclo-oxigenase 2 (COX-2) atua inibindo a infiltração de neutrófilos e sua inibição aumenta a presença dessas células no tecido (Wallace, 2006). Dessa forma, a inibição da COX-2 possivelmente induzida pela hidrocortisona pode ter contribuído para o aumento no escore para presença de neutrófilos observado na mucosa após duas horas de isquemia.

- ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL

Na literatura consultada, não foram encontrados relatos da utilização da MEV associada à análise histológica para a avaliação de lesões de IR no cólon maior, entretanto essa metodologia já foi empregada em estudos do cólon menor (FALEIROS, 2003) e jejuno (PAGLIOSA, 2009) ou em estudos descritivos sobre anatomia e fisiopatologia intestinal (PFEIFER; MacPERSON, 1990).

A associação entre as avaliações histológica e ultra-estrutural possibilitou uma maior acuidade na avaliação da intensidade das lesões presentes na mucosa, uma vez que a análise dos cortes histológicos e das imagens obtidas pela MEV foram realizadas associadamente, permitindo uma maior precisão quando da avaliação de cortes histológicos em que houve dúvida quanto ao grau de lesão na mucosa presente.

Ao delinear o projeto, nossa expectativa era de que a MEV pudesse ser utilizada para avaliar o grau de lesão na mucosa através da mensuração das áreas de descamação do epitélio por meio de programas de processamento de imagem; permitindo a quantificação objetiva da lesão presente na mucosa e sua comparação estatística. Entretanto, o material amorfo, provavelmente composto de alimento, muco, microorganismos e restos teciduais, observado na superfície da mucosa em várias das amostras examinadas pela MEV, dificultou a avaliação das alterações produzidas na mucosa durante a isquemia e a reperfusão, comprometendo parcialmente sua utilização no presente estudo.

No estudo referido anteriormente conduzido por Faleiros (2003), a metodologia de processamento das amostras foi semelhante à utilizada no presente estudo, e não houve referência a dificuldades na visualização da mucosa, possivelmente devido ao fato de que a avaliação foi apenas descritiva, não tendo sido realizadas mensurações de lesão no epitélio.

No estudo conduzido por Pagliosa (2009) a MEV foi empregada para mensurar o diâmetro das vilosidades do jejuno de equinos submetido a IR por distensão, e a avaliação foi conduzida sem dificuldades. Entretanto, podem ter contribuído para esse resultado o fato de que o líquido utilizado para realizar a distensão tenha se encarregado de remover o material aderido à mucosa nas amostras colhidas ao final da isquemia, e que a presença de alimento no intestino tenha sido eliminada pelo jejum de 12h que foi empregado. Além disso, a ausência de células caliciformes no intestino faz com que o muco presente nesta porção do intestino apresente maior fluidez (PFEIFER; MacPERSON, 1990), possibilitando que esse tenha sido efetivamente eliminado da mucosa através da lavagem realizada com solução de Ringer após a colheita das amostras.

Caso a possibilidade de interferência do material amorfo na visualização da mucosa houvesse sido antecipada, poderiam ter sido adotadas estratégias na tentativa de minimizar esse problema, como uma limpeza mecânica mais intensa utilizando gaze ou irrigação sob pressão, ou ainda a aplicação de agentes que permitissem a dissolução do muco. Restariam as considerações sobre a possibilidade de esses agentes produzirem artefatos na mucosa, interferindo na avaliação das lesões, o que acarretaria a necessidade da condução de um estudo específico para validar essas técnicas.

- MIELOPEROXIDASE

Quando confrontados com os achados histológicos, os resultados para atividade de MPO foram discrepantes. Nos equinos dos três grupos a atividade de MPO foi alta nas amostras colhidas em T0 e não foram observadas variações que, ainda que sem significância, expressassem tendência de aumento da atividade de MPO durante a isquemia e reperfusão. Ao contrário, os escores para presença de neutrófilos se elevaram durante a isquemia e a reperfusão nas três camadas do cólon avaliadas em todos os grupos experimentais, sendo esse aumento significativo na submucosa, quando comparados os tempos T0 e I2. Além disso, verificou-se redução significativa na atividade de MPO quando comparadas as amostras colhidas em T0 e R12dist, o que não possui justificativa plausível.

A avaliação da atividade de MPO tem sido utilizada como indicadora da presença de neutrófilos no tecido em outras espécies (GRISHAM; GRANGER, 1988; ZIMMERMAN et al. 1990) e em equinos (VATISTAS et al., 1993; YARBROUGH et al., 1994; VAN HOOOGMOED et al., 2001a; PAGLIOSA, 2009), entretanto sua utilização nessa espécie tem produzido resultados variáveis.

Moore et al (1994a) conduziram um estudo de IR no cólon maior de equinos em que foi observada intensa variação nos níveis de MPO mensurados. O nível de MPO basal foi alto em todos os grupos estudados, e não foi detectada variação significativa ao longo do tempo no cólon submetido a isquemia de baixo fluxo por 3

horas seguida de três horas de reperfusão ou após seis horas de isquemia ininterrupta. Além disso, os níveis de MPO não diferiram do basal em nenhum dos tempos avaliados apesar de terem sido demonstrados aumentos significativos de atividade da MPO através de parâmetros histológicos.

A presença de grande quantidade de eosinófilos no cólon também pode ter interferido na análise da MPO. Os ensaios bioquímicos disponíveis não são específicos para a peroxidase de neutrófilos, sendo incapazes de distinguir entre a peroxidase presente em monócitos, eosinófilos e neutrófilos (MOORE et al., 1994a). A quantidade de eosinófilos no intestino não foi avaliada no presente estudo, entretanto durante o exame das lâminas sua presença foi comumente observada na mucosa e submucosa (Figura 7), o que está em conformidade com os achados de Meschter et al (1986). Rotting et al. (2008), verificaram grande quantidade de eosinófilos no trato gastrointestinal do equino e constataram que sua presença no cólon é quatro vezes superior à observada no jejuno. Dessa forma, possivelmente a presença de eosinófilos em elevado número verificada nas amostras contribuiu para o alto nível basal de mieloperoxidase, dificultando a demonstração de significância dos resultados obtidos nas comparações entre tempos.

Adicionalmente, ao contrário do verificado em experimentos conduzidos com isquemia de baixo fluxo (MOORE et al., 1994b), a presença de edema e hemorragia foi marcante nos segmentos experimentais durante a isquemia e a reperfusão, e essas alterações, ao aumentar intensamente a quantidade de água no tecido (Figura 3), provavelmente produziram um efeito de diluição da MPO na amostra, prejudicando a acuidade da sua determinação nas amostras I2, R2 e R12. Além disso, o edema e a hemorragia resultaram em intenso espessamento das amostras colhidas após duas horas de isquemia e duas e doze horas de reperfusão, e como para o ensaio bioquímico de MPO foram utilizados apenas 100mg de tecido, é pertinente considerar a possibilidade de ter havido erro na seleção das amostras, havendo o predomínio de uma camada do intestino em detrimento de outra na alíquota selecionada para o exame.

- CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TRATAMENTOS EMPREGADOS
 - **Associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina.**

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento com a associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina não atenuou as lesões decorrentes de IR induzidas no cólon maior. Em um estudo anterior, no entanto, foi demonstrado que a hidrocortisona atenua os efeitos IR no jejuno (ALVES et al., 2003), e os autores consideraram que esse resultado poderia decorrer de seu efeito na inibição de mediadores da inflamação e na liberação de glutamina do tecido muscular, o que aumentaria sua disponibilidade na circulação para o epitélio intestinal durante a reparação da mucosa. Pagliosa (2009) utilizando a hidrocortisona em associação semelhante à utilizada no presente estudo, também verificou que o tratamento contribuiu para a regeneração precoce da mucosa intestinal utilizando modelo de isquemia venosa. Possivelmente a explicação para a discrepância entre os resultados obtidos no jejuno e no cólon maior resida nas diferenças recentemente observadas entre os processos de reparação desses dois segmentos do intestino.

A expressão aumentada de ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e COX-2 na mucosa do jejuno de equinos foi demonstrada por TOMLINSON et al., (2004), entretanto a magnitude da expressão de COX-2 é maior no cólon maior (MORTON et al, 2009). Nesse segmento do intestino a expressão de COX-1 e COX-2 foi demonstrada no tecido saudável predominantemente na lâmina própria. Após períodos de isquemia de uma a duas horas e de reperfusão variando de 30 minutos a 18 horas verificou-se o aumento na expressão de COX-1 somente no epitélio luminal, enquanto o aumento na expressão de COX-2 ocorreu tanto no epitélio luminal quanto nas criptas, o que foi considerado como indicador da expressão de COX-2 pelas população de células estromais das pericriptas no intuito de produzir prostaglandina E_2 e promover a proliferação epitelial e reparação da mucosa lesada (MORTON et al, 2009).

De acordo com Masferrer et al. (1992), os glicocorticóides exercem efeito inibidor específico sobre a COX-2, o que foi confirmado por Appleton et al. (1996). Dessa forma, a inibição da COX-2 possivelmente produzida pela hidrocortisona nos equinos do Grupo A pode explicar a ineficácia da associação terapêutica utilizada em atenuar os efeitos da IR verificada neste estudo, ao interferir na reparação da mucosa intestinal.

Em estudos sobre a reparação da mucosa do jejuno após IR foi demonstrado que agentes antiinflamatórios que possuem maior seletividade para a inibição da COX-1 como o flunixin meglumine retardam a reparação da mucosa, o que não foi observado com a utilização de agentes COX-2 específicos como o meloxicam (LITTLE et al, 2007). Por outro lado, Morton et al. (2009), avaliando a reparação do cólon após IR, verificaram que o tratamento com 1,1mg/Kg flunixin meglumine IV, administrado ao início da fase de reperfusão e repetido 12 horas após, não interferiu na reparação da mucosa do cólon quando avaliado após 18 horas.

Outras diferenças como o maior número de eosinófilos residentes no cólon maior quando comparado com o jejuno podem ter contribuído para justificar as diferenças na eficácia dos tratamentos testados entre os obtidos no presente estudo e aqueles obtidos por Pagliosa (2009). Rotting et al (2008), estudando a distribuição de eosinófilos no trato digestivo de equinos verificou que a quantidade de eosinófilos presentes na mucosa do cólon é aproximadamente quatro vezes superior à observada no jejuno.

A relação entre os eosinófilos residentes e a fisiopatologia das lesões decorrentes de isquemia e reperfusão no intestino ainda não é bem conhecida, entretanto a quimiotaxia e migração de eosinófilos desencadeada por injúrias à mucosa do cólon maior foi demonstrada por Rotting et al. (2003), e, esses autores consideram que os eosinófilos podem ter papel importante na fisiopatologia de lesões decorrentes de isquemia no intestino.

A utilização do dimetilsulfóxido e do ácido ascórbico no presente estudo decorreu de suas potencialidades em eliminar radicais livres de oxigênio.

O dimetilsulfóxido é comumente utilizado no tratamento pré e pós operatório de pacientes portadores de abdome agudo (WHITE, 2006). Apesar de vários estudos terem relatado sua ineficácia em atenuar as lesões decorrentes de IR no intestino,

esse foi utilizado com base nos resultados positivos de Sullins na prevenção de aderências e de Dabareiner et al. (2005) na redução da permeabilidade da microvasculatura. A dose empregada, de 20mg/Kg, foi semelhante à utilizada por Sullins et al. (2004), entretanto, nesse estudo essa foi utilizada BID durante as 72 horas que precederam a indução da isquemia. Além disso, as doses preconizadas de dimetilsulfóxido variam amplamente podendo chegar a 1mg/Kg (Arden et al.,1990), o que dificulta a decisão da escolha de dose a ser utilizada e pode ter interferido na sua eficácia. No estudo de Dabareiner et al. (2005) por sua vez, os efeitos positivos dessa droga foram evidenciados após isquemia de apenas uma hora, induzida pelo modelo de baixo fluxo, onde as lesões causadas são menores.

O ácido ascórbico foi utilizado no presente estudo devido à sua reconhecida capacidade de seqüestrar radicais livres de oxigênio e aos resultados de Freeman et al. (1998) que demonstraram sua eficácia em antagonizar os efeitos de radicais livres na mucosa do jejuno de equinos *in vitro.*, entretanto esse não havia ainda sido testado *in vivo* . A dose empregada foi a comumente utilizada para o tratamento de outras condições na espécie, o que pode não ter sido suficiente.

Uma vez que o objetivo principal do emprego do dimetilsulfóxido e do ácido ascórbico foi sua ação antioxidante, ao considerar os motivos de seu insucesso deve levar-se em conta que a participação dos radicais livres de oxigênio na fisiopatologia da isquemia e reperfusão ainda permanece especulativa, e que alguns autores chegaram a concluir que sua importância na espécie equina é reduzida (VATISTAS et al., 1998, SOFFLER, 2007).

Já a pentoxifilina foi incluída na associação testada devido a seus efeitos benéficos na microcirculação, além de sua ação na formação de RLOs. Ao contrário do que foi observado no presente estudo, sua eficácia na IR foi demonstrada por Abreu (2003) utilizando modelo de ISQ-V no jejuno. Como a pentoxifilina foi empregada em associação a outras drogas, é especulativo inferir se essa foi benéfica ou não, uma vez que eventuais efeitos indesejáveis de outros componentes da associação podem ter mascarado seus efeitos positivos. A hemorragia e edema verificados na mucosa e submucosa no presente estudo foram de tal intensidade que poderia ser considerada a hipótese de que as lesões tenham sido de tal magnitude

que impediram a visualização de eventuais efeitos benéficos do dimetilsulfóxido e da pentoxifilina.

- **Glutamina**

A glutamina foi empregada no presente estudo devido a sua reconhecida importância na reparação da mucosa intestinal, além de seus potenciais efeitos antioxidantes, uma vez que constitui o principal precursor da glutathione. Adicionalmente, em um estudo onde a hidrocortisona foi empregada na IR do jejuno e foi eficaz em facilitar a reparação da mucosa (RIO TINTO, 1999), considerou-se a possibilidade de que esse efeito tenha sido influenciado pela reconhecida capacidade da hidrocortisona de aumentar a liberação de glutamina da musculatura (MULBACHER et al., 1984), aumentando sua disponibilização para o epitélio da mucosa intestinal (RIO TINTO, 1999). No presente estudo o emprego da glutamina não foi eficaz em atenuar os efeitos da IR, o que contrasta com os resultados de Pagliosa (2009) que demonstraram que a glutamina contribuiu para acelerar a reparação da mucosa. Como o regime terapêutico empregado foi semelhante em ambos os estudos, cabem considerações sobre eventuais diferenças entre os efeitos dos modelos de IR no jejuno e no cólon, bem como sobre a fisiologia da reparação da mucosa nesses segmentos. No experimento conduzido por Pagliosa (2009) no jejuno, o modelo de isquemia empregado, a duração das fases de isquemia e reperfusão e o sistema de avaliação das alterações produzidas foram semelhantes ao do presente estudo, entretanto, a intensidade das lesões produzidas foi expressivamente superior, variando os escores médios de 3,3 após duas horas de isquemia para 4,2 após duas horas de reperfusão, em escala máxima de 5, no Grupo Controle, enquanto que no presente estudo os escores obtidos variaram entre 0,7 e 1,6 nos mesmos tempos no Grupo C. Dessa forma pode-se considerar a possibilidade de que a produção de lesões de menor intensidade no presente estudo pode ter dificultado a evidência de possíveis efeitos benéficos da glutamina.

Além disso, Duckworth et al (1992) sugerem que a utilização de glutamina pelo cólon é menor que no jejuno, o que poderia expressar uma menor importância desse aminoácido na reparação de lesões nesse segmento. Adicionalmente, esses autores demonstraram que 60 minutos após a administração IV de uma dose aproximadamente duas vezes superior à empregada no presente estudo, os níveis sanguíneos de glutamina retornam à normalidade, permitindo inferir que para contribuir efetivamente na reparação intestinal, teria sido mais adequada a administração da glutamina em infusão contínua.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi conduzido, os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- O tratamento com a associação de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, ácido ascórbico e pentoxifilina não atenuou as lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon maior ou acelerou a reparação da mucosa intestinal.
- O tratamento com glutamina não atenuou as lesões decorrentes de isquemia e reperfusão induzidas no cólon maior ou acelerou a reparação da mucosa intestinal.
- O modelo de indução de isquemia venosa utilizado foi eficaz em induzir alterações no intestino, e permitiu evidenciar a ocorrência da lesão de reperfusão.

REFERÊNCIAS

ABREU J. M. G.. **Apoptose e efeitos da pentoxifilina, da glutathione e do ozônio no jejuno de equinos sob isquemia, congestão e reperfusão**. 91p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003.

ABREU, J. M., 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**. v.59, n.1, p.35-40. 2007.

ALVES, G. E. S.; RIO TINTO, J. J. M.; FALEIROS, R. R.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Hidrocortisona atenua a lesão de reperfusão e acelera a reparação da mucosa após isquemia venosa experimental no jejuno de eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.5, p.539-549, 2003.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A. T.; WILLOUGHBY, D. A. Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Advances in Pharmacology**, v. 35, p. 27-78, 1996.

ARDEN, W. A.; STICK, J. A.; PARKS, A. H.; CHOU, C.C.; SLOCOMBE, R.F. Effects of ischemia and dimethyl sulfoxide on equine jejunal vascular resistance, oxygen consumption, intraluminal pressure, and potassium loss. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 3, p. 330 -387, 1989.

ARDEN, W. A.; SLOCOMBE, R. F.; STICK, J. A. ; PARKS, A.H. Morphologic and ultrastructural evaluation of effect of ischemia and dimethyl sulfoxide on equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 11, p. 1784-1791, 1990.

BADYLAK, S. F.; LANTZ, G. C.; JEFFRIES, M. Prevention of reperfusion injury in surgically induced gastric dilatation-volvulus in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, p. 294-299, 1990.

BARTON, M.H.; MOORE, J.N.; NORTON, N. Effects of pentoxifylline infusion on response of horse to in vivo challenge exposure with endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.11, p. 1300-1306, 1997.

BEHREND, E. N.; KEMPPAINEN, R. J. Glucocorticoid therapy: pharmacology, indications, and complications. **Veterinary Clinics of North America: Small Animals Practice**, v. 27, n. 2, p. 187-213, 1997.

BLIKSLAGER, A. T.; ROBERTS, M. C.; GERARD, M. P.; ARGENZIO, R.A. How important is intestinal reperfusion injury in horses? **American Journal of Veterinary Associate**, v. 211, n. 11, p. 1387-1389, 1997.

BLIKSLAGER, A. T.; ROBERTS, M. C.; ARGENZIO, R. A. Prostaglandins I2 and E2 have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in ischemic-injured intestine. In: EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, 6, 1998, Athens. **Proceedings**. Athens: 1998, p.40. Abstract.

BLIKSLAGER, A. T. Principles of intestinal injury and determination of intestinal viability. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine surgery**. 3. ed. Saint Louis: Saunders & Elsevier, 2006. p. 12-23.

BOROS, M.; KARÁCSONY, G.; KASZAKI, J.; NAGI, S. Reperfusion mucosal damage after complete intestinal ischemia in the dog: the effects of antioxidant and phospholipase A2 inhibitor therapy. **Surgery**, v. 113, n. 2, p. 184-191, 1993.

BRYANT, C. E.; ELLIOTT, J. Nitric oxide: friend or foe? **Equine Veterinary Edition**, v. 6, n. 2, p. 59-64, 1994.

BURGUEZ, P. N.; OUSEY, J.; CASH, R. S. G.; ROSSDALE, P.D. Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 1, p. 58-60, 1983.

BURTON, J. N.; KEHRLI, M. E. Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of Staphylococcus aureus in milk of cortisol and dexametasone treated cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 997-1006, 1995.

BYRKA-OWCZAREK, K.; STEPLEWSKA-MAZUR, K. KRASON, M.; BOHOSIEWICZ, J.; KOSZUTSKI, T.; WOJTYNEK, G. The evaluation of the protective action of antioxidants on small intestine of rabbits experimentally injured by ischemia and reperfusion. **Journal of Pediatrics**, v. 39, p. 1226-1229, 2004.

CHIU, C.; 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**, v. 101, n. 10, p. 484-488, 1970a.

CHIU, C., SCOTT, H. J., GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low flow states II. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate. **Archives of Surgery**, v. 101, n. 10, p. 489-502, 1970b.

CICALESE, L.; CARACENI, P.; NALESNIK, M. A.; BORLE, A.B.; SCHRAUT, W.H. Oxygen free radical content and neutrophil infiltration are important determinants in mucosal injury after rat small bowel transplantation. *Transplantation*, v. 62, n. 2, p. 161-166, 1996.

COOK, V. L., JONES SHULTS, J., McDOWELL, M., CAMPBELL, N.B., DAVIS, J. L., BLIKSLAGER, A. T. Attenuation of ischaemic injury in the equine jejunum by administration of systemic lidocaine. *Equine Veterinary Journal*. V.40, n. 4, p. 353-357, 2008.

DABAREINER, R. M; WHITE, N. A.; LEMASTERS, J. J. Effect of a reperfusion solution Carolina rinse on intestinal vascular permeability and blood flow after jejunal ischemia and reperfusion in the horse. **Veterinary Surgery**, v. 23, n. 5, p. 399, 1994.

DABAREINER, R. M.; SNYDER, J. R.; WHITE, N. A. Microvascular permeability and endothelial cell morphology associated with low-flow ischemia/reperfusion injury in the equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 5, p. 639-648, 1995.

DABAREINER, R. M; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. L. Effects of intraluminal distension and decompression on the microvascular permeability and hemodynamics of the equine jejunum. In: **Equine colic research Symposium**. 6, 1998, Athens. **Proceedings**... Athens: 1998a, p. 45. Abstract.

DABAREINER, R. M; WHITE, N. A.; DONALDSON, L. L., GREED, J. Evaluation of Carolina rinse as a treatment for ischemia-reperfusion of the equine jejunum. **Veterinary Surgery**, v. 27, n. 5, p. 521, 1998b

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

DABARAINER, 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**. v. 66, n. 3, p 525-536, 2005.

DONALDSON, L.L.; WHITE, N.A.; DABAREINER, E.S; EICHORN. Cardiopulmonary effects of Carolina rinse in dorsally recumbent, halothane anesthetized healthy horses. In: EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, 6, 1998. **Proceedings**. Athens: 1998, p. 53. Abstract.

DUCKWORTH, D., MADISON, J. B., CALDERWOOD-MAYS, M., GLEED, J. Arteriovenous differences for glutamine in the equine gastrointestinal tract. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 10, p. 1864-1866, 1994.

FALEIROS, R. R. **Isquemia e reperfusão experimental no cólon menor de eqüinos**. 1997. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

FALEIROS R. R. **Obstrução experimental do cólon menor eqüino: aspectos clínicos, patológicos e terapêuticos**. 2003. 253f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

FERRARI, R.; CECONI, C., CURELLO, S.; CARGONI, A.; PASINI, E.; DEGIULI, F.; ALBERTINI, A. Role of oxygen free radicals in ischemic an reperfused myocardium. **American Journal of Clinical Nutrition**, v 55, n. 21, p. 215s - 222s, 1991.

FLAHERTY, J. T., WEISFELDT, M. L. Reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 5, p. 409-419. 1988.

FORSYTH, S. F., GUILFORD, W. G. Ischaemia-reperfusion injury - a small animal perspective. **British Veterinary Journal**, v.151, n. 3, p. 281-198. 1995.

FREEMAN, D. E., CIMPRICH, R. E., RICHARDSON, D. W., GENTILE, D. G., ORSINI, J. A., TULLENERS, E. P., FETROW, J. P. Early mucosal healing and chronic changes in pony jejunum after various types of strangulation obstruction. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n.6, p. 810-818, 1988.

FREEMAN, D. E.; JOHNSTON, J. K.; LAWS, E. G. Failure of superoxide dismutase to mitigate changes caused by ischemia and reperfusion in horse intestine. **Veterinary Surgery**, v. 21, n. 4, p. 389, 1992.

FREEMAN, D. E. Effects of reactive oxygen metabolites on structure and function of equine colonic and jejunal mucosa *in vitro*. In: EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, 6, 1998, Athens. **Proceedings...** Athens: 1998, p. 38. Abstract.

GAFFIN, S. L; GATHIRAM, P.; WELLS, M.; BROCK-UTNEE, J.G. Effect of corticosteroid prophylaxis on lipopolysaccharide levels associated with intestinal ischemia in cats. **Critical.Care Medicine.**, v. 14, n. 10, p. 889-891, 1986.

GLEED, R. D. Postanesthetic myopathy. In: NIXON, A. J.(Ed.) **Equine fracture repair**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 343-349.

GOLDFIEN, A. Corticosteróides supra-renais e antagonistas córtico-supra-renais. In: KARTZUNG, B. G. (Ed.) **Farmacologia básica e clínica**. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 408-419.

GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annual Review of Physiojogy*, v. 57, p.311-332, 1995.

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**, v. 90, n. 1, p. 80-84, 1986.

GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Neutrophil-mediated mucosal injury role of reactive oxygen metabolites. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 33, n. 3, p. 6S-15S, 1988.

HAGLUND, U.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N. On the pathophysiology of intestinal ischemic injury. **Acta Chirurgica Scandinavica**, v. 153, n. 5-6, p. 321-324, 1987.

HAGLUND, U.; HULTÉN, L.; AHREN, C. Mucosal lesions in the human small intestine in shock. **Gut**, v. 16, n. 10, p. 979-984, 1975.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics - what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 3-20, 1994.

HENNINGER, D. D.; SNYDER, J. R.; PASCOE, J. R. Capillary permeability changes associated with ischemia/reperfusion injury in the equine ascending colon and the protective effects of dimethyl sulfoxide and terbutaline. **Veterinary Surgery**, v. 20, n. 4, p. 338, 1991.

HERNANDEZ, L. A.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. A role for iron in oxidant-mediated ischemic injury to intestinal microvasculature. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. G49-G53, 1987a.

HERNANDEZ, L. A. GRISHAM, M. B.; TWOHIG, B.; ARFORS, K.E.; HARLAN, J.M.; GRANGER, D.N. Role of neutrophil in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. H699-H703, 1987b.

HIGGINS, A. J.; LEES, P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of antiinflammatory drugs. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 3, p. 163-173, 1984.

HOOGMOED, L. V.; SNYDER, J. Use of pelvic flexure biopsies to predict survivability of horses following large colon torsion. In: EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, 6, 1998, Athens. **Proceedings...** Athens: 1998, p. 64. Abstract.

HORNE, M. M.; PASCOE, P. J.; DUCHARME, P. G.; BARKER, I.K.; GROVUN, W.L. Attempts to modify reperfusion injury of equine jejunal mucosa using dimethylsulfoxide, allopurinol, and intraluminal oxygen. **Veterinary Surgery**, v.23, p. 241-249, 1994.

HUBBELL, J. A. E. Monitoring. . p. 153-159. In: MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E. **Equine anaesthesia monitoring and emergency therapy**. Mosby. St. Louis, p. 153-159, 1991.

IKEDA, H., SUZUKI, Y., KOIKE, M., TAMURA, J., TONG, J, NOMURA, M. ITOH, G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischemia and ischemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. **Gut**. v. 42, n. 8, p.530-537, 1998.

INOUE, O. J.; FREEMAN, D. E.; WALLIG, M. Effects of hypochlorous acid and ascorbic acid on conductance, permeability, and structure of the colonic mucosa in vitro. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 82-87, 1998.

JEROME, S. N.; KONG, L.; KORTHUIS, R. J. Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. **Journal of Investigative Surgery**, v. 7, n. 1, p. 3-16, 1994.

KALPRAVIDH, M.; LUMB, W. V.; WHIGHT, M. Effects of butorphanol, flunixin, levorphanol, morphine, and xylazine in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 2, p. 217-223, 1984.

KEARNS, S. R; KELLY C. J; BARRY M.; ABDIH, H.; CONDRON C.; LEAHY A.; BOUCHIER-HAYES, D. Vitamin C reduces ischaemia-reperfusion-induced acute lung injury. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 17, n. 6, p. 533-536. 1999.

KETAN, S. R; SHUREY, S. ,GREEN, C. J. Characterization of apoptosis in intestinal ischemia-reperfusion injury – a light and electron microscopic study. **International Journal of Experimental Pathology**. vol. 78, n. 6, p. 355-363. 1997.

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**, v. 59, n. 3, p. 340-346, 1998.

KUBES, P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. G143-G149, 1993.

KUBES, P.; HUNTER, J.; GRANGER, D. N; Ischemia-reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. **Gastroenterology**, v. 103, n. 3, p. 807-812, 1992.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. 859-864, 1990.

KURTEL, H.; TSO, P.; GRANGER, D. N. Granulocyte accumulation in postischemic intestine: role of leukocyte adhesion glycoprotein CD11/CD18. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. G878-G882, 1992.

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**, v. 53, n. 9, p. 1594-1598, 1992.

LAWS, E. G., FREEMAN, D. E. Significance of reperfusion injury after venous strangulation obstruction of horse jejunum. **Veterinary Surgery**, v. 23, n. 5, p. 407, 1994.

LEW, W.; OPPENHEIM, J. J.; MATSUSHIMA, K. Analysis of the suppression of IL-1 α and IL-1 β production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. **Journal of Immunology**, v. 140, n. 6, p. 1895-1902, 1988.

LITTLE, D., BROWN, A., CAMPBELL, N. B., MOESER, A., J., DAVIS, J., BLIKSLAGER, A. T. Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 6, p. 614-624, 2007.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Arms Force Institute of Pathology**. 3 ed. 257p. New York: McGraw Hill, 1968.

LUNA, S. P. L.; TAYLOR, P. M.; MASSONE, F. Midazolam and ketamine induction before halothane anaesthesia in ponies: cardiorespiratory, endocrine and metabolic changes. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy**, v. 20, n. 2, p. 153-159, 1997.

LUNDIN, C.; SULLINS, K. E.; WHITE, N. A.; CLEM, M.F; DEBOWES, R.M.; PFEIFFER, C.A. Induction of peritoneal adhesions with small intestinal ischaemia and distension in the foal. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 6, p. 451-458, 1989.

MANGINO, M. J.; ANDERSON, C. B.; MURPHY, M. K.; BRUNT, E.; TURK, J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia reperfusion injury. *American Journal of Physiology*, v. 257, p. G299-G307, 1989.

MANSBACH, C. M. Phospholipases: old enzymes with new meaning. **Gastroenterology**, v. 98, n. 5, p. 1369-1382, 1990.

MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; ZWEIFEL, B. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 3917-3921, 1992.

MASSEY, K. D.; BURTON, K. P. α -Tocopherol attenuates myocardial membrane-related alterations resulting from ischemia and reperfusion. **American Journal of Physiology**, v. 256, p. H1192-H1199, 1989.

MAY, S. A. Anti-inflammatory Agents. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 3 ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 14-16.

MAZZAFERRO, E.; HACKETT, T.; WINGFIELD, W.; OGILVIE, G.; FETTMAN, M. Role of glutamine in health and disease. **Compendium Continuous Education**, v.22, n.12, p.1094-1103, 2000.

MATYJASZEC, S. A., MORTON, A. J., FREEMAN, D. E., GROSCHE, A., POLYAK, M. M. R. Effects of flunixin meglumine on recovery of colonic mucosa from ischemia in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 236-246, 2009.

McCORD, J, M. Oxygen derived free-radicals in post-ischemic tissue injury. **New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

McDONALD, L. E. Hormônios que influenciam o metabolismo. In: BOOTH, N.H., McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 493-526.

MEGISON, S. M; HORTON, J. W.; CHAO, H.; WALKER, P.B. Prolonged survival and decreased mucosal injury after low-dose enteral allopurinol prophylaxis in mesenteric ischemia. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 25, n. 8, p. 917-921, 1990.

MESCHTER, C. L.; CRAIG, D.; HACKETT, R. Histopathological and ultrastructural changes in simulated large colonic torsion and reperfusion in ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 426-433, 1991.

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**, v. 47, n. 3, p. 598-606, 1986.

METZE, K. Distúrbios da circulação. In: Brasileiro Filho, G. **Bogliolo – Patologia geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 80-110.

MIRZA, M. H.; MOORE, R. M.; SEAHORN, T. L. Detection of nitric oxide in horses with large colon volvulus. **Proceedings of Annual Meeting of American Associate Equine Practice**, v. 43, p. 403-404, 1997.

MIRZA, M. H.; SEAHORN, T. L.; OLIVER, J. L. Detection and comparison of nitric oxide in clinically normal horses and those with large colon volvulus. In: EQUINE COLIC RESEARCH SYMPOSIUM, 6, 1998, Athens. **Proceedings...** Athens: 1998, p.30. Abstract.

MITSUDO, S.; BRANDT, L. J. Pathology of intestinal ischemia. **Surgical Clinics of North America**, v. 72, n. 1, p. 43-63, 1992.

MOORE, R. M.; WHITE, N. A.; TRIM, C. M.; GARNER, H.E. Effect of intraluminal oxygen in intestinal strangulation obstruction in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 10, p. 1615-1620, 1980.

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**, v. 55, n. 10, p. 1454-1463, 1994a.

MOORE, R. M.; BERTONE, A. L.; MUIR, W. W.; STROMBERG, P.C.; BEARD, W.L. Histopatological evidence of reperfusion injury in the large colon of the horse after low-flow ischemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 10, p. 1434-1443, 1994b.

MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; BERTONE, A. L. Effects of dimethyl sulfoxide, allopurinol, 21-aminosteroid u-74389G, and manganese chloride on low-flow ischemia and reperfusion of the large colon in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 5, p. 671-687, 1995a.

MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, p. 115-132, 1995b.

MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; CAWRSE, M.; BERTONE, A.L.; BEARD, W.L. Systemic and colonic venous plasma eicosanoid and endotoxin concentrations, and colonic venous serum tumor necrosis factor and interleukin-6 activities in horses during low-flow ischemia and reperfusion of the large colon. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 5, p. 656-663, 1995b.

MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 3, p. 115-132, 1995c.

MOORE, R. M. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. **American Journal of Veterinary Medicine Associate**, v.211, p. 1362- 1366, 1997.

MOORE R. M.; MUIR, W. W.; BERTONE, A. L.; OLIVER, J. L: Effect of platelet-activating factor antagonist L-691,880 on low-flow ischemia-reperfusion injury of the large colon in horses. **Veterinary Surgery**. v. 27. n. 2. p. 37-48, 1998.

MORRIS, D. D.; STRZEMIENSKI, P. J; GAULIN,G. The effects of corticosteroid administration on the migration, phagocytosis and bactericidal capacity of equine neutrophils. **Cornell Veterinary**, v. 78, n. 3, p. 243-252, 1988.

MORTON, A. J., GROSCHE, A., ROTTING, A. K., MATYJASZEC, BRIKSLAGER, A. T., D. E., FREEMAN. Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in the left dorsal colon after different durations of ischemia and reperfusion in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70,n. 12, p. 1536-1544, 2009.

MUELLER, A. R.; NALESNIK, M.; LANGREHR, J. M.; RAO, P.N.; SNYDER, J.T.; HOFFMAN, R.A.; SCHRAUT, W.H. Evidence that small bowel preservation causes primarily basement membrane and endothelial rather than epithelial cell injury. **Transplantation**, v. 56, n. 6, p. 1499-1504, 1993.

MUELLER, A. R.; NALESNIK, M.; PLATZ, K.; LANGREHR, J.M.; HOFFMAN, R.A.; SCHRAUT, W.H. Evaluation of preservation conditions and various solutions for small bowel preservation. **Transplantation**, v. 57, n. 3, p. 649-655, 1994a.

MUELLER, A. R.; PLATZ, K. P.; LANGREHR, J. M.; HOFFMAN, R.A.; NUSSLER, A.K.; NALESNIK, M.; BILLIAR, T.R.; SCHRAUT, W.H. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. **Transplantation**, v. 58, n. 12, p. 1309-1316, 1994b.

MUHLBACHER, F.; KAPADIA, C. R.; COLPOYS, M. F. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. E75-E83, 1984.

MUIR, W. W. Standing chemical restraint in horses. In: MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E. **Equine anaesthesia monitoring and emergency therapy**. St. Louis: Saunders, 2009a. p. 185-209.

MUIR, W. W. Intravenous anesthetic drugs. In: MUIR, W. W.; HUBBELL, J. A. E. **Equine anaesthesia monitoring and emergency therapy**. St. Louis: Saunders, 2009b. p. 243-259.

NOVELLI, G. P.; ADEMBRI, C.; GANDINI, E.; ORLANDINI, S.Z.; PAPUCCI, L.; FORMIGLI, L.; MANNESCHI, L.I.; QUATTRONI, A.; PRATESI, C.; CAPACCIOLI, S. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. **American Journal of Surgery**, v. 173, n. 3, p. 206-209, 1997.

OTAMIRI, T.; FRANZÉN, L.; LINDMARK, D.; TAGESSON, C. Increased phospholipase A2 and decreased lysophospholipase activity in the small intestinal mucosa after ischaemia and revascularisation. **Gut**, v. 28, n. 11, p. 1445-1453, 1987.

OTAMIRI, T.; LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Phospholipase A₂ inhibition prevents mucosal damage with small intestinal ischaemia in rats. **Gut**, v. 29, n. 4, p. 489-494, 1988.

OTAMIRI, T.; TAGESSON, C. Role of phospholipase A2 and oxygenated free radicals in mucosal damage after small intestinal ischemia and reperfusion. **American Journal of Surgery**, v.157, n. 5, p. 562-566, 1989.

OZAKI, M., FUCHINOUE, S., TERAOKA, S. OTA, K. The in vivo cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reoxygenation injury of rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 2, p. 439-445, 1995.

PAGLIOSA, G. M. **Lesões decorrentes de obstruções experimentais no jejuno de equinos tratados com glutamina ou associação de succinato sódico de hidrocortisona, dimetilsulfóxido, pentoxifilina e ácido ascórbico**. 66p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.

PARKS, D. A., GRANGER, D. N. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. **American Journal of Physiology**, v. 245, p. G285-G289, 1983.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **American Journal of Physiology**, v. 250, p. G749-G753, 1986.

PARKS, D. A.; GROGAARD, B.; GRANGER, D. N. Comparison of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. **Surgery**, v. 92, n. 5, p. 896-901, 1982.

PEREIRA, F. E. L. Etiopatogênese geral das lesões. In: Brasileiro Filho, G. (Ed) Bogliolo - **Patologia geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 19-37, 1998.

PFEIFFER, C. J., MACPERSON, B. R. Anatomy of the gastrointestinal tract and peritoneal cavity In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Malvern: N. A. WHITE, 1990. p. 2-24.

PRICHARD, M.; DUCHARME N. G.; WILKINS, P. A.; ERB, H.N.; BUTT, M. Xantine oxidase formation during experimental ischemia of the equine small intestine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 6, p. 310-314, 1991.

PROVOST, P. J.; STICK, J. A.; PATTERSON, J. S. Effects of heparin treatment on colonic blood flow and oxygenation. **American Journal of Veterinary Research**. v. 52, n. 3, p. 289-297, 1991.

RAKESTRAW, P. C.; SNYDER, J. R.; WOLINER, B. S.; SANDERS, K.M.; SHUTTLEWORTH, C.W. Involvement of nitric oxide in inhibitory neuromuscular transmission in the equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 8, p. 1206-1213, 1996.

RAND-LUBY, L.; POMMIER, R. F.; WILLIAMS, S.T., WOLTERING, E.A.; SMALL, K.A.; FLETCHER, W.S. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Annals of Surgery**, v. 224, n. 4, p. 583-590, 1996.

REEVES, M. J.; VASTEENHOUSE, J.; STASHAK, T. S.; YOVICH, J.V.; COCKERELL, G. Failure to demonstrate reperfusion injury following ischaemia of the equine large colon using dimethyl sulphoxide. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 2, p. 126-132, 1990.

RIO TINTO J. J. M. **Lesões de isquemia e reperfusão experimentais no jejuno de eqüinos: tratamento com succinato sódico de hidrocortisona**. 1999. 82p Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

ROBERTSON, J. T.; MUIR, W. W.; SAMS, R. Cardiopulmonary effects of butorphanol, tartrate in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 41-44, 1981.

ROBINSON, N. E. Table of drugs: approximate doses. In: ROBINSON, N.E. (ed). **Current therapy in equine medicine**. 3 ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 815-821.

ROCHAT, M. C. An introduction to reperfusion injury. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 6, p. 923-930, 1991.

ROTTING, A. K.; FREEMAN, D. E.; CONSTABLE, P. D.; EURELL, J. A. C.; WALLIG, M. A. Mucosal distribution of eosinophilic granulocytes within the gastrointestinal tract of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v 69, n. 7, 874-879, 2008.

ROTTING, A. K.; FREEMAN, D. E.; EURELL, J. A. C. Effects of acetylcysteine and migration of resident eosinophils in an in vitro model of mucosal injury and restitution in equine right dorsal colon. **American Journal of Veterinary Research**. v 64, n. 10, 1205-1212, 2003.

RUGGLES, A. J.; FREEMAN, D. E.; ACLAND, H. M., FITZSIMMONS, M. Changes in fluid composition on the serosal surface of jejunum and small colon subjected to venous strangulation obstruction in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n.2, p. 333-340, 1993.

SAMPAIO, I. B. M. Delineamento em blocos ao acaso. In: _____ **Estatística aplicada à experimentação animal**. Editora FEP-MZV, Belo Horizonte, p. 50-60, 1998.

SEQUEIRA, J. L.; KUCHEMBUCK, M. R.; DA SILVA, C.A. Utilização da biópsia intestinal no prognóstico dos processos patológicos digestivos dos equinos. **Ars Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 231, 1994a.

SEQUEIRA, J. L.; KUCHEMBUCK, M. R.; LAUFER, R. Achados histopatológicos do trato gastrintestinal de eqüinos em casos de cólica fatal. **Ars Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 232, 1994b.

SERTEYN, D.; MOTTART, E.; DEBY, C.; DEBY-DUPONT, G.; PINCEMAIL, J.; PHILIPART, C.; LAMY, M. Equine postanaesthetic myositis: a possible role for free radical generation and membrane lipoperoxidation. **Research in Veterinary Science**, v. 48, n. 1, p. 42-46, 1990.

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

SHUTE, K. Effect of intraluminal oxygen on experimental ischaemia of the intestine. **Gut**, v. 17, n. 12, p. 1001-1006, 1976.

SIRIN, B. H; YILIK, L.; COSKUN E.; ORTAC R.; SIRIN H. Pentoxifylline reduces injury of the brain in transient ischaemia. **Acta Cardiologica**. Vol. 53, n. 2, p. 89-95. 1998.

SISLEY, A. C.; DESAI, T.; HARIG, J. M, GREED; J. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. **Journal of Surgery Research**, v. 57, n. 1, p. 192-196, 1994.

SNYDER, J.R.; HOLANDER, H.J.; PASCOE, J.R.; HOLLAND, M.; KURPERSHOEK, C.J. Morphologic alterations observed during experimental ischemia of the equine large colon. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 801-809, 1988.

SOBEL, B. E.; CORR, P. B.; ROBISON, A. K.; GOLDSTEIN, R.A.; WITKOWSKI, F.X.; KLEIN, M.S. Accumulation of lysophosphoglycerides with arrhythmogenic properties in the ischemic myocardium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 62, n. 6, p. 546-553, 1978.

SOFFLER, C. Oxidative stress. **The Veterinary Clinics of North America**. v. 23, n. 1, p. 135-157, 2007.

STICK, J. A., LOEFFLER, B. S., ARDEN, W. A. Butorphanol tartarate: effects on vascular pressure, jejunal blood flow, vascular resistance, O₂ extraction, and O₂ uptake in ponies. **Veterinary Surgery**, v. 18, n. 1, p. 67, 1989.

STICK, J. A.; ARDEN, W. A.; ROBINSON, R. A.; SHOBE, E.M.; HOTH, R.A. Tromboxane and prostacyclin production in ponies with colonic volvulus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 4, p. 563-568, 1992.

STONE, W. C.; BJORLING, D. E.; SOUTHARD, J. H.; GALBREATH, E.J.; LINDSAY, W.A. Evaluation of intestinal villus height in rats after ischemia and reperfusion by administration of superoxide dismutase, polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase, and two 21-aminosteroids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p. 2153-2156, 1992.

SULLINS, K. E. Intestinal adhesion reduction. In: White, N. A. (Ed). **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 245-250.

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

SULLINS, K. E.; WHITE, N. A.; LUNDIN, C. S.; DABAREINER, R.; GAULIN, G. Prevention of ischaemia-induced small intestinal adhesions in foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, p. 370-375, 2004.

TAGESSON, C.; FRANZÉN, L.; DAHL, G.; WESTRÖN, B. Lysophosphatidylcholine increases rat ileal permeability to macromolecules. **Gut**, v. 26, n. 4, p. 369-377, 1985.

TOMLINSON, J. E.; WILDER, B. O.; YOUNG, K. M. Effects of flunixin meglumine or etodolac treatment on mucosal recovery of equine jejunum after ischemia. **American Journal of Veterinary Research**, v 65, n. 6, 761-769, 2004.

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**, v. 219, n. 1, p. 67-71, 2001.

VAN HOOGMED, L. M.; SNYDER, J. R.; NIETO, J. HARMON, F. A. TIMMERMAN, B., L. Effect of a leukocyte-depleting filter in a extracorporeal circuit used for low-flow ischemia and reperfusion of equine jejunum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p 87-96, 2001a.

VAN HOOGMED, L. M.; SNYDER, J. R.; NIETO, J. HARMON, F. A. In vitro evaluation of a customized solution for use in attenuating effects of ischemia and reperfusion in the equine small intestine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 12, p 1679-1686, 2001b.

VAN HOOGMOED, L. M.; NIETO J. E.; SNYDER JR.; HARMON F. A. In vitro evaluation of an intraluminal solution to attenuate effects of ischemia and reperfusion in the small intestine of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.10, p.1389-94, 2002.

VATISTAS, N. J.; SNYDER, J. R.; HILDEBRAND, S. V.; HARMON, F.A.; WOLINER, M.J.; HENRY, P.; ENOS, L.R; MAGLIANO, D.; BROWN, S.A.; DRAKE, C. Effects of the 21-aminosteroid U-74389G on ischemia and reperfusion injury of the ascending colon in horses. **American Journal of Veterinary Research**. v.54, n.12, p.2155-2160, 1993.

VATISTAS, N. J.; SNYDER, J. R.; HILDEBRAND, S. V.; HARMON, F.A.; WOLINER, M.J.; BARRY, S.J.; NIETO, J.; HENRY, P.; ENOS, L.R.; MAGLIANO, D.; BROWN, S.A.; DRAKE, C. Effects of U-74389G, a novel 21-aminosteroid, on small intestinal ischemia and reperfusion injury in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 5, p. 762-770, 1996.

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 xantine oxidase activity in the equine jejunum during low flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 6, p. 772-776, 1998.

VERASTEGUI, T.C.V. **Efeitos da injeção intra-intestinal de oxigênio, perfluorocarbono, glicose hipertônica a 10% e cloreto de sódio a 0,9% nas isquemias intestinais de origem arterial, venosa e mista. Estudo experimental em ratos.** 90p. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte. 1995.

WALLACE, J. L. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. **Scientific World Journal**. n. 6, v 7. p. 577-588, 2006.

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**, v. 41, n. 2, p.193-198, 1980.

WHITE, N. A. Epidemiology and etiology of colic . In: White, N. A. (Ed). **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 49-64.

WHITE, N. A. Alterations in the intestines during obstruction and ischemia. In: CICLO INTERNACIONAL DE CÓLICA EQUINA, 2, 1995, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: 1995, p.39-47.

WHITE, N. A. Pathophysiology of obstruction, strangulation and strangulation/obstruction. In: COLAHAN, P. T.; MERRITT, A. M.; MOORE, J. N.; MAYHEW, I. G. (Ed.). **Equine medicine and surgery**. 5. ed. Saint Louis: Mayhew editora, 1999.

WHITE, N. A. Treatments for colic. In: ANNUAL CONVENCTION OF THE AAEP, 2006, San Antonio. **Anais...** San Antonio, 2006. p. 153-169.

WILKINS, P. A.; DUCHARME, N. G.; LOWE, J. E.; SCHWARK, W.S.; MESCHTER, C.; ERB, H.N. Measurements of blood flow and xantine oxidase activity during postischemic reperfusion of the large colon of ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 8, p. 1168-1177, 1994.

WILSON, D. V.; PATTERSON, J. S.; STICK, J. A.; PROVOST, P.J. Histologic and ultrastructural changes after large-colon tordsion, with and without use of a specific platelet-activating factor antagonist (WEB 2086), in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 5, p. 681-688, 1994.

WONG, J. M.; BILLIAR, T. R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Advances in Pharmacology**, v. 34, p. 155-170, 1995.

YARBROUGH, B.; SNYDER, J. R.; HARMON, F. A. Evaluation of myeloperoxidase concentrations in experimentally induced equine colonic ischaemia and reperfusion. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 1, p. 67-69, 1994.

ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion injury. **Surgical Clinics of North. America**, v. 72, n. 1, p. 65-83, 1992.

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**, v. 99, n. 5, p. 1358-1363, 1990.

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 xantine oxidase activity in the equine jejunum during low flow ischemia and reperfusion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 6, p. 772-776, 1998