LUANA BEATRIZ VITORETTI

**Perfil temporal da inflamação pulmonar
induzida pela isquemia/reperfusão intestinal
em ratos. Estudo do papel do sistema linfático.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção de Título
de Mestre em Ciências.

São Paulo

2010

LUANA BEATRIZ VITORETTI

**Perfil temporal da inflamação pulmonar
induzida pela isquemia/reperfusão intestinal
em ratos. Estudo do papel do sistema linfático.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção de Título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Wothan Tavares de Lima

São Paulo

2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vitoretti, Luana Beatriz.

Perfil temporal da inflamação pulmonar induzida pela
isquemia/reperfusão intestinal em ratos. Estudo do papel do sistema
linfático / Luana Beatriz Vitoretti. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Wothan Tavares de Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de
concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação pulmonar
induzida por isquemia e reperfusão intestinal em ratos.

Versão do título para o inglês: Time profile of lung inflammation
induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. Study of the role of
the lymphatic system.

Descritores: 1. Isquemia 2. Doenças pulmonares 3.
Isquemia/Reperfusão intestinal 4. Sistema linfático 5. Inflamação
pulmonar 6. SDRA I. Lima, Wothan Tavares de II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB031/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luana Beatriz Vitoretti.

Título da Dissertação: Perfil temporal da inflamação pulmonar induzida pela isquemia/reperfusão intestinal em ratos. Estudo do papel do sistema linfático.

Orientador(a): Wothan Tavares de Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **080** nas fls. **19** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, Coordenador da Linha de Pesquisa "***Estudo ex-vivo dos mecanismos reguladores da interação leucócito-endotélio após trauma esplâncnico e sua relevância para a inflamação pulmonar: envolvimento do sistema linfático***" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Ana Cristina Breithaupt Faloppa, Gabriela Cavriani e o pesquisador Ricardo Martins de Oliveira-Filho**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.08.2005**.

São Paulo, 23 de agosto de 2005.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.017/07.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 80/05/CEEA, aprovo a inclusão das alunas LUANA BEATRIZ VITORETTI, FERNANDA SALERNO DE ARRUDA E ELIZANDRA CAMARGO MARONATO ao protocolo intitulado: *"Estudo ex-vivo dos mecanismos reguladores da interação leucócito-endotélio após trauma esplâncnico e sua relevância para a inflamação pulmonar: envolvimento do sistema linfático"*, para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação do Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 01 de junho de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice-Coordenador da CEEA- ICB/USP

À minha mãe pelo amor, apoio e amizade de todas as horas.
Uma pessoa especial que eu admiro e amo muito.

Agradecimentos

Ao Prof. Wothan pela orientação, discussões e cafezinhos, mas principalmente pela amizade. Quando eu crescer quero ser como você!!!!

A Ana Cristina pela participação ativa durante todo o trabalho, por sua imensa ajuda e pela amizade.

Ao Prof. Ricardo pelas correções e revisões, ensinamentos e apoio.

A Prof^a Lia pelos ensinamentos e empréstimo do laboratório.

As mulheres do laboratório: Ana Paula, Beatriz, Clariana, Adriana, Helory, Isabelli, Mayara, Renata e Zilma pela amizade, auxílio, baladas e hooraas de diversão.

Ao João, um amigo especial. Companheiro de todas as horas e dono de um coração sem tamanho. Tche tche tche!!!!

A Elke, Aline, Renata, Débora, Vinícius, Cleyton, Jean, Japão, Raquel, Eduardo e todos os outros amigos pelas horas de descontração e alívio do estresse.

A minha irmã Letícia. A gente briga, mas a gente se ama!

A Nany, Nina, Mel e Cindy pelo amor incondicional, carinho e companheirismo.

Ao Manuel pela dedicação, atenção e cuidados com os animais.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Farmacologia pelo convívio e amizade.

Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

A FAPESP pelo indispensável auxílio financeiro (07/56872-5).

Resumo

VITORETTI, L.B. **Perfil temporal da inflamação pulmonar induzida pela isquemia/reperfusão intestinal em ratos. Estudo do papel do sistema linfático.** 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

Estudos clínicos e experimentais relatam a que a isquemia e reperfusão (I/R) intestinal induz lesão pulmonar aguda (LPA), que em casos mais graves evolui para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A LPA se caracteriza pela liberação de um amplo espectro de mediadores inflamatórios, infiltração de neutrófilos e aumento de permeabilidade vascular. Sabe-se que mediadores inflamatórios gerados no local da I/R intestinal são transportados pelo sistema linfático mesentérico e, ao atingirem o pulmão, contribuem para a LPA. Por outro lado, dados sobre os efeitos tardios da I/R intestinal e do papel do sistema linfático na LPA ainda são fragmentados. No presente estudo ratos machos Wistar anestesiados foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal pela obstrução da artéria mesentérica superior e a 24 h, 72 h ou 120 h de reperfusão. Estudos onde o ducto linfático torácico superior foi bloqueado antes da I/R intestinal também foram conduzidos. Decorrido o tempo desejado de reperfusão intestinal quantificamos a atividade de mieloperoxidase (MPO), o extravasamento do corante azul de Evans (AE), mediadores inflamatórios na linfa e em explante de pulmão. Foram também quantificadas a expressão de moléculas de adesão e o efeito do tratamento dos animais com antibiótico de amplo espectro. A I/R intestinal causou aumento de atividade da MPO e de AE extravasado no pulmão 120 h após a reperfusão intestinal sendo que o bloqueio do fluxo linfático atenuou o AE extravasado. A linfa dos animais I/R intestinal revelou níveis elevados de IL-1 β , IL-6, VEGF e LTB₄. No explante de pulmão detectamos aumento da concentração de VEGF e de IL-1 β e redução de IL-10 120 h após a reperfusão intestinal com o ducto linfático intacto ou bloqueado em relação aos outros períodos estudados. A I/R intestinal de 120 h aumentou o número de monócitos, de plaquetas circulantes e o hematócrito em relação aos demais períodos de reperfusão intestinal. Nossos dados também indicaram diminuição da expressão de vWf e aumento de integrina β_1 , PECAM-1 e colágeno tipo I e IV no endotélio pulmonar dos animais 120 h após o início da reperfusão em relação aos demais períodos. O tratamento com antibiótico teve maior ou menor eficácia em reduzir a MPO e o AE extravasado no pulmão, 120h após a reperfusão, dependendo do período da isquemia ou da reperfusão em que o medicamento foi administrado. Concluindo, os dados apresentados indicam que o tempo de reperfusão intestinal medeia a inflamação pulmonar. Mediadores inflamatórios presentes na linfa e na circulação participam do desencadeamento/manutenção da inflamação pulmonar, alterando a integridade do endotélio pulmonar. É possível que a regulação do controle endógeno da inflamação seja alterada de maneira que uma infecção bacteriana possa contribuir para a inflamação pulmonar observada após 120 h de reperfusão intestinal.

Palavras-chave: Isquemia/reperfusão intestinal. Inflamação pulmonar. SDRA. Sistema linfático. Mediadores inflamatórios.

Abstract

VITORETTI, L.B. **Time profile of lung inflammation induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. Role of the lymphatic system.** 2010. 144 p. Dissertation (Pharmacology Masters Degree) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Experimental and clinical studies have reported that intestinal ischemia/reperfusion (I/R) induces acute lung inflammation (ALI), which can lead, in severe cases, to acute respiratory distress syndrome (ARDS). ALI is characterized by the release of many inflammatory mediators, neutrophil infiltration and increased vascular permeability. It is known that inflammatory mediators generated at the site of intestinal I/R are transported by the mesenteric lymphatic system and, reaching the lungs, contributes to the ALI. Furthermore, data on late effects of intestinal I/R and the role of the lymphatic system in ALI are still fragmented. In the present study, male Wistar rats were subjected to 45 min of intestinal ischemia due to obstruction of the superior mesenteric artery and then to 24 h, 72 h or 120 h of reperfusion. Studies in which the thoracic lymphatic duct was blocked before intestinal I/R were also done. After the desired time of reperfusion the activity of myeloperoxidase (MPO), the extravasation of Evans blue dye (EB), inflammatory mediators in the lymph and in lung explants were quantified. We also quantified the expression of endothelial molecules and the effect of treatment with a broad-spectrum antibiotic. The intestinal I/R increased the MPO activity and the EB extravasated in lung 120 h after reperfusion. The blockade of lymph flow attenuated the EB extravasated. Lymph collected from intestinal I/R animals contained significant amounts of IL-1 β , IL-6, VEGF and LTB₄. Cultured lung explants from 120 h-reperfused animals revealed increased amounts of VEGF and IL-1 β , whereas IL-10 decreased. The intestinal I/R 120 h increased the number of monocytes, of circulating platelets and the hematocrit compared to other periods of reperfusion. Our data also revealed decreased expression of vWf and increased expression of integrin β_1 , PECAM-1 and collagen type I and IV in the pulmonary endothelium of animals I/R 120 h. Treatment with antibiotic was more or less effective in reducing the MPO and the EB extravasation in the lung, 120 h after reperfusion, depending on the period of ischemia or reperfusion when the drug was administered. In conclusion, our data indicate that the time of reperfusion mediates lung inflammation. Lymph and blood-borne inflammatory mediators participate in the onset/maintenance of pulmonary inflammation by altering the integrity of the pulmonary endothelium. It is possible that the regulation of endogenous control of inflammation is altered so that a bacterial infection may contribute to pulmonary inflammation observed after 120 h of reperfusion.

Key words: Intestinal ischemia/reperfusion. Lung inflammation. ARDS. Lymphatic system. Inflammatory mediators.

Lista de Abreviaturas

AE: Azul de Evans
BSA: Bovine Serum Albumin
D.O.: Densidade Óptica
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPM: Erro Padrão da Média
E-selectina: Selectina Endotelial
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
HMGB1: High-Mobility Group Box-1
HSPs: Heat-Shock Proteins
I/R: Isquemia e Reperfusão
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule
IL: Interleucina
i.m.: intramuscular
INF: Interferon
i.p.: intraperitoneal
LPS: Lipopolissacarídeo
L-selectina: Selectina Leucocitária
LT: Leucotrieno
MMP: Metaloproteinase de Matriz
MPO: Mieloperoxidase
NF-κB: Nuclear Factor-κB
NO: Nitric Oxide
PAF: Platelet-Activating Factor
PBS: Phosphate Buffered Saline
PECAM: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PG: Prostaglandina
PGI: Prostaciclina

PMN: Polimorfonuclear

P-selectina: Selectina Plaquetária

PV: Permeabilidade Vascular

TBS-T: Tris-Buffered Saline Tween-20

TFM: Tissue Freezing Medium

TNF: Tumor Necrosis Factor

TXA: Tromboxana A

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VE-caderina: Vascular Endothelial Caderina

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

vWf: von Willebrand factor

Lista de Fármacos e Reagentes

Abcam: Colágeno tipo I, colágeno tipo IV.

BD Biosciences[®]: IL-1 β , IL-6, IL -10, VEGF.

Biogenex: AEC

Cayman: LTB₄

Chemicon International: PECAM-1, vWf, VE-caderina

Cultilab: BSA, DMEM

Fort-Dodge: Pentabiótico

Leica Instruments: Tissue Freezing Medium

Merck: Azul de Evans, hidrato de cloral, peróxido de hidrogênio, EDTA.

Pfizer: Cloridrato de tramadol

Santa Cruz: Fibronectina, integrina β_1

Sigma: hexadecil-tri-metil-amônio (HTAB), azida sódica, orto-dianisidina.

Vetec: Formamida

Lista de Figuras

Figura 1. Perfil temporal do curso da SDRA	25
Figura 2. Esquema de indução da isquemia e reperfusão intestinal	34
Figura 3. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de pulmão	41
Figura 4. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de intestino	43
Figura 5. Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) pulmonar.....	45
Figura 6. Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) intestinal	47
Figura 7. Quantificação de IL-1 β , IL-6, VEGF e LTB ₄ na linfa de animais submetidos à I/R intestinal.....	49
Figura 8. Quantificação de IL-1 β em sobrenadante de explante pulmonar.....	51
Figura 9. Quantificação de IL-6 em sobrenadante de explante pulmonar.....	53
Figura 10. Quantificação de VEGF em sobrenadante de explante pulmonar	55
Figura 11. Quantificação de LTB ₄ em sobrenadante de explante pulmonar	57
Figura 12. Quantificação de IL-10 em sobrenadante de explante pulmonar.....	59
Figura 13. Resumo da quantificação de mediadores inflamatórios em explante pulmonar ...	61
Figura 14. Quantificação de leucócitos totais no sangue de animais submetidos à I/R intestinal.....	63
Figura 15. Quantificação de granulócitos no sangue de animais submetidos à I/R intestinal.....	65
Figura 16. Quantificação de linfócitos no sangue de animais submetidos à I/R intestinal....	67
Figura 17. Quantificação de monócitos no sangue de animais submetidos à I/R intestinal...	69
Figura 18. Quantificação de plaquetas no sangue de animais submetidos à I/R intestinal	71
Figura 19. Efeito da I/R intestinal sobre o hematócrito.....	73
Figura 20. Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal no número de células sanguíneas.....	75
Figura 21. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de vWf no endotélio pulmonar	77
Figura 22. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-vWf.	78
Figura 23. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de integrina β_1 no endotélio pulmonar.....	80
Figura 24. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-integrina β_1	81

Figura 25. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de PECAM-1 no endotélio pulmonar.....	83
Figura 26. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-PECAM-1.....	84
Figura 27. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar.....	86
Figura 28. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-VE-caderina..	87
Figura 29. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de fibronectina no endotélio pulmonar.....	89
Figura 30. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-fibronectina	90
Figura 31. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de colágeno tipo I no endotélio pulmonar.....	92
Figura 32. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-colágeno tipo I...	93
Figura 33. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de colágeno tipo IV no endotélio pulmonar.....	95
Figura 34. Imuno-histoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-colágeno tipo IV.....	96
Figura 35. Resumo ds efeitos temporais da I/R intestinal na expressão de moléculas endoteliais.....	98
Figura 36. Efeitos do tratamento com pentabiótico na atividade de MPO pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal.....	100
Figura 37. Efeitos do tratamento com pentabiótico na permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal após 120 h de reperfusão intestinal.....	102
Figura 38. Efeito da I/R intestinal na sobrevida dos animais	104

Sumário

1 Introdução	18
<i>1.1 Isquemia e Reperusão (I/R)</i>	<i>18</i>
<i>1.2 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)</i>	<i>22</i>
<i>1.3 Sistemas gastrointestinal, linfático e modulação da SDRA</i>	<i>25</i>
<i>1.4 Inflamação e angiogênese</i>	<i>27</i>
<i>1.5 Reparação tecidual</i>	<i>28</i>
2 Objetivos.....	32
3 Material e Métodos.....	33
<i>3.1 Animais</i>	<i>33</i>
<i>3.2 Indução da isquemia e reperusão intestinal.....</i>	<i>33</i>
<i>3.3 Avaliação da repercussão pulmonar e intestinal induzida pela I/R intestinal.....</i>	<i>34</i>
<i>3.3.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....</i>	<i>34</i>
<i>3.3.2 Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal</i>	<i>35</i>
<i>3.4 Canulação do ducto linfático torácico e obtenção da linfa</i>	<i>35</i>
<i>3.5 Cultura de tecido pulmonar (explante).....</i>	<i>36</i>
<i>3.6 Determinação de mediadores inflamatórios</i>	<i>36</i>
<i>3.7 Análise hematológica</i>	<i>37</i>
<i>3.8 Análise histológica e imuno-histoquímica do tecido pulmonar.....</i>	<i>37</i>
<i>3.9 Tratamento farmacológico</i>	<i>38</i>
<i>3.10 Análise estatística.....</i>	<i>39</i>
4 Resultados	40
<i>4.1 Caracterização dos efeitos da I/R intestinal sobre o pulmão e o intestino</i>	<i>40</i>
<i>4.1.1 Atividade de MPO</i>	<i>40</i>
<i>4.1.1.1 Pulmão</i>	<i>40</i>
<i>4.1.1.2 Intestino.....</i>	<i>42</i>
<i>4.1.2 Extravasamento do corante Azul de Evans</i>	<i>44</i>
<i>4.1.2.1 Pulmão</i>	<i>44</i>
<i>4.1.2.2 Intestino.....</i>	<i>46</i>
<i>4.2 Quantificação de mediadores inflamatórios</i>	<i>48</i>

<i>4.2.1 Amostras de linfa</i>	48
<i>4.2.2 Sobrenadante de explante pulmonar</i>	50
4.2.2.1 IL-1β	50
4.2.2.2 IL-6	53
4.2.2.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)	54
4.2.2.4 Leucotrieno B₄ (LTB₄)	56
4.2.2.5 IL-10	58
4.3 Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal na liberação pulmonar de mediadores inflamatórios	60
4.4 Análise hematológica	62
<i>4.4.1 Leucócitos totais</i>	62
<i>4.4.2 Granulócitos</i>	64
<i>4.4.3 Linfócitos</i>	66
<i>4.4.4 Monócitos</i>	68
<i>4.4.5 Plaquetas</i>	70
<i>4.4.6 Hematócrito</i>	72
4.5 Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal sobre o número de leucócitos sanguíneos	74
4.6 Análise imuno-histoquímica de pulmão	76
<i>4.6.1 Efeito da I/R intestinal na expressão de vWf nos vasos pulmonares</i>	76
<i>4.6.2 Efeito da I/R intestinal na expressão de integrina β_1 nos vasos pulmonares</i>	79
<i>4.6.3 Efeito da I/R intestinal na expressão de PECAM-1 nos vasos pulmonares</i>	82
<i>4.6.4 Efeito da I/R intestinal na expressão de VE-caderina nos vasos pulmonares</i>	85
<i>4.6.5 Efeito da I/R intestinal na expressão de fibronectina nos vasos pulmonares</i>	88
<i>4.6.6 Efeito da I/R intestinal na expressão de colágeno I nos vasos pulmonares</i>	91
<i>4.6.7 Efeito da I/R intestinal na expressão de colágeno IV nos vasos pulmonares</i>	94
4.7 Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal sobre a expressão de moléculas endoteliais	97
4.8 Repercussão pulmonar e intestinal do tratamento com antibiótico	99
<i>4.8.1 Atividade de MPO pulmonar</i>	100
<i>4.8.2 Extravasamento do corante Azul de Evans no pulmão e intestino</i>	101
4.9 Taxa de sobrevivência	103
5 Discussão	105

6 Conclusões	123
Referências bibliográficas	125
Anexo..	147

1 Introdução

1.1 Isquemia e reperfusão (I/R)

Conceitualmente, *isquemia* é a deficiência no aporte sanguíneo a determinados órgãos ou tecidos por diminuição da luz de artérias, arteríolas ou capilares. Uma vez instalada, causa diversas alterações do metabolismo, as quais resultam na redução de reservas energéticas, acúmulo de metabólitos tóxicos e eventualmente necrose tecidual (SUN, et al., 1998; SCARABELLI et al., 2002; CERQUEIRA et al., 2005).

A *reperfusão* tecidual é a situação onde o suprimento sanguíneo interrompido pela isquemia é restaurado. Acredita-se que produtos tóxicos gerados durante a isquemia sejam, na vigência da reperfusão, removidos e possam, ao ter acesso à circulação, promover importantes alterações no estado funcional do organismo. Tais alterações podem culminar em lesões teciduais locais e distantes do sítio onde foi desencadeada a isquemia (para revisão, ver BERTHIAUME et al., 1999). Nesse contexto, a lesão pulmonar e a falência múltipla dos órgãos ocupam lugar de destaque (HALLDORSSON et al., 2000).

Estudos revelam que na vigência de isquemia e reperfusão intestinal (I/R intestinal), citocinas e interleucinas geradas no intestino, tais como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e o INF- γ , são disseminadas sistemicamente e concorrem para a lesão inflamatória pulmonar (DEITCH et al., 2001). De forma geral, os efeitos dessas citocinas se relacionam com o aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de neutrófilos, indução de necrose e apoptose celular, aumento de permeabilidade vascular e edema tecidual (GRANGER e KORTHUIS, 1995; MAXWELL e LIP, 1997; CHOPRA et al., 2009). Existem também evidências de translocação bacteriana tanto pela via circulatória quanto pelo sistema linfático mesentérico após a I/R intestinal. Apesar disto, a relevância clínica de translocação bacteriana durante o trauma isquêmico intestinal ainda é revestida de dúvidas (FOEX, 2005). No contexto do trauma intestinal, mecanismos endógenos são acionados levando à explosão inflamatória sistêmica e/ou pulmonar após I/R intestinal. Dada a complexidade da resposta inflamatória causada pela I/R intestinal, diversos estudos consideram o envolvimento da resposta imune inata nos mecanismos orquestradores da lesão tecidual causada pela I/R intestinal (APRAHAMIAN et al., 2008; EDGERTON et al.,

2009). Durante a I/R intestinal o dano tecidual e celular pode gerar fragmentos celulares e produtos derivados da degradação de componentes da matriz extracelular (ácido hialurônico, fibrinogênio, fibronectina). Nestas condições, o sistema imune inato é estimulado, os receptores do tipo “Toll” (TLR), notadamente os TLR4, são acionados, desenvolvendo uma resposta inflamatória estéril (MOSES et al., 2009). A inflamação estéril pode se associar à lesão local, sistêmica e ao desenvolvimento de lesão pulmonar aguda (WARD et al., 2008). Além disso, estudos revelam a participação de células do sistema imune adaptativo, notadamente linfócitos T e B, na modulação das lesões teciduais causadas pela I/R, demonstrando que os linfócitos estão envolvidos com o recrutamento de neutrófilos para o sítio da isquemia (SHIGEMATSU et al., 2002; HURN et al., 2007; LINFERT et al., 2009;). Um aspecto de interesse é que nem o papel da imunidade inata na sinalização deflagrada pela I/R intestinal nem o envolvimento dos linfócitos na inflamação pulmonar subsequente foram explorados. Em contraste, existem dados sobre o envolvimento de linfócitos T e B na indução de alterações hepáticas, renais e sistêmicas após a I/R intestinal (BURNE et al., 2001; CALDWELL et al., 2005; HORIE et al., 1999). Assim, reforça-se o papel dos sinais de perigo como sinalizadores para o sistema imune inato e para o controle da resposta inflamatória. Conceitualmente, os sinais de perigo são moléculas ou estruturas moleculares liberadas ou produzidas por células sob estresse e que são percebidas por células apresentadoras de antígeno, resultando no desencadeamento da resposta imune (GALLUCCI e MATZINGER, 2001). O ligante de CD40, o TNF- α , a IL-1 β e componentes intracelulares, como o ATP, são sinais de perigos clássicos (SALLUSTO et al., 1995; SCHNURR et al., 2000). Além destes, é importante reconhecer o papel das HSP (heat shock protein), HMGB-1 (high mobility group box1) e do ácido úrico como sinais de perigo gerados tanto no trauma como na inflamação pulmonar (FLOHÉ et al., 2009; GASSE et al., 2009).

O TNF- α e a IL-1 β são citocinas da fase aguda da inflamação secretadas por diversos tipos celulares, principalmente por macrófagos (PASS et al., 1995). O TNF- α é descrito como importante modulador da inflamação e do edema pulmonar ocasionado pela I/R intestinal. Estudos experimentais demonstram o aumento dos seus níveis plasmáticos durante a I/R intestinal, sendo a lesão pulmonar aguda com infiltrado neutrofílico e aumento da permeabilidade características de inflamação pulmonar observadas em modelos de injeção intravenosa de TNF- α (OKUSAWA et al., 1998). Além disso, Koksoy et al. (2001) mostraram que o bloqueio do TNF- α com anticorpos reduz o infiltrado de neutrófilos e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar induzido pela I/R intestinal. No entanto,

Gaines et al. (1999) demonstraram que em animais submetidos a I/R da pata anterior, o tratamento com receptores solúveis para TNF- α reduz a lesão microvascular, mas não o recrutamento pulmonar de neutrófilos, demonstrando o complexo papel desta citocina na lesão e inflamação pulmonar aguda pós I/R. A capacidade da IL-1 β de potencializar o efeito do TNF- α durante a inflamação aguda e crônica é bem descrita na literatura (BRADDOCK e QUINN, 2004). A IL-1 β exerce papel fundamental na indução da lesão local e remota ocasionada pela I/R de membros posteriores em ratos (SEEKAMP e WARD, 1993). Souza et al. (2003) demonstraram que o bloqueio dos receptores de IL-1 β com antagonista ou com soro anti IL-1 β resulta em significativo aumento na lesão tecidual e letalidade decorrente de I/R intestinal, lançando dúvidas sobre o papel pró-inflamatório desta citocina. Uma possível explicação seria o papel da IL-1 β na indução da IL-10, que por sua vez exerceria ação antiinflamatória modulando o dano pós I/R (SOUZA et al., 2003). Por outro lado, dados do nosso grupo mostraram que os níveis séricos de IL-1 β estão elevados em ratos submetidos a I/R intestinal (CAVRIANI et al., 2007), e que sua neutralização previne a hiporreatividade brônquica induzida pela I/R intestinal (COELHO et al., 2007). Vale lembrar que o sistema linfático é importante via de ligação entre a IL-1 β gerada pela I/R intestinal e a inflamação pulmonar observada. Assim como o TNF- α , IL-1 β e IL-10, a IL-6 também é encontrada em altos níveis no soro após a I/R intestinal (GROTZ et al., 1999; NARITA et al., 2004; CAVRIANI et al., 2007). Além disso, estudos demonstram que a instilação intranasal de IL-6 em ratos normais promove recrutamento de neutrófilos e edema pulmonar (HIERHOLZER et al., 1998) e que o intestino sob trauma é capaz de gerar IL-6 (GROTZ et al., 1999). Esta citocina também tem sido considerada como marcador de gravidade da inflamação em situações de trauma gastrointestinal (DAMAS et al., 1992; FARMER et al., 1994) e, juntamente com a IL-10, de mortalidade em paciente com pneumonia após alta hospitalar (YENDE et al., 2008).

É interessante notar que o fenótipo inflamatório é regulado também por complexa rede de mediadores com efeitos antiinflamatórios (por exemplo, IL-10 e corticóides). Como consequência, o controle interno da inflamação pode ser obtido por meio da redução da síntese e/ou dos efeitos dos mediadores inflamatórios. Barnes (2000) discutiu a existência de mecanismos endógenos controladores da inflamação pulmonar, os quais são desencadeados por estímulos outros que não a I/R intestinal. A IL-10 é uma citocina homodimérica produzida por monócitos, macrófagos, células T e células epiteliais (FIORENTINO et al., 1991). Experimentalmente, a administração de concentrações farmacológicas de IL-10 demonstrou efetiva proteção em modelos de endotoxemia aguda e de sepse por ligação e

perfuração do ceco (CLP) (KATO et al., 1995; VAN DER POLL et al., 1995; VAN DER POLL et al., 1997). Apesar do mencionado, em modelos de CLP o papel da IL-10 endógena é controverso. Remick et al. (1998) evidenciam que a IL-10 endógena não possui efeito protetor, contrastando com Van der Poll et al. (1995) que demonstraram o papel protetor da IL-10 endógena em modelo de CLP. Stallion et al. (2002) utilizando camundongos “knockout” para IL-10 demonstraram que, apesar de regular a produção de IL-6, a IL-10 endógena não protege o animal contra o dano intestinal e a inflamação sistêmica em modelo de I/R intestinal.

Além das citocinas, outros mediadores, tais como o PAF, NO, prostanóides e leucotrienos, participam do controle da inflamação causada pela I/R intestinal e interferem com o estado funcional dos leucócitos. De fato, existem diversos estudos mostrando o papel desses mediadores no controle do recrutamento e/ou ativação de neutrófilos (revisão BHATIA e MOOCHHALA, 2004). Campbell e Blikslager (2000) mostraram que o bloqueio da síntese de prostanóides previne a lesão intestinal desencadeada pela I/R intestinal. Mangino et al. (1997), estabeleceram correlação positiva entre a liberação de tromboxana A₂ (TXA₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrieno B₄ (LTB₄) e leucotrienos peptídicos (LTC₄, LTD₄, e LTE₄) e o desenvolvimento de lesão da mucosa intestinal após I/R intestinal. Turnage et al. (1995), detectaram a liberação de quantidades apreciáveis de TXA₂ em pulmão isolado de animais submetidos à I/R intestinal. Níveis de PGE₂ também estão elevados no plasma e no pulmão de animais submetidos a I/R intestinal (TURNAGE et al., 1997). Vale ressaltar que o bloqueio dos receptores do fator de agregação plaquetária (PAF) causa liberação de TXB₂, prostaciclina (PGI₂) e PGF_{2α}, sugerindo a existência de interação do PAF com prostanóides no choque causado pela I/R intestinal (FILEP et al., 1991). Aliás, os efeitos do PAF, como agregação plaquetária, adesão de neutrófilos, aumento de permeabilidade vascular, hipotensão arterial, hipertensão pulmonar e ativação endotelial se associam à lesão tecidual causada pela I/R intestinal (NAGASE et al., 1999).

A I/R intestinal, como mencionado, é um problema clínico que se associa ao desenvolvimento de inflamação sistêmica, disfunção da microcirculação pulmonar e desencadeamento da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo - SDRA (CATY et al., 1990; HILL et al., 1992; CARDEN et al., 1993; HARWARD et al., 1993; XIAO et al., 1997). Diversos relatos indicam que indivíduos submetidos à I/R intestinal desenvolvem lesão pulmonar aguda (MITSUOKA et al., 1999; KOKSOY et al., 2001; KUZU et al., 2002). Nesse sentido, a despeito de seus efeitos benéficos inquestionáveis, a reperfusão tecidual subsequente aos quadros de isquemia, é importante fator de risco para o

desencadeamento de lesões teciduais generalizadas graves onde o pulmão é o principal órgão afetado.

1.2 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

Estudos indicam que uma das mais importantes consequências sistêmicas da reperusão de um órgão sob isquemia é o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda, a qual pode evoluir para a SDRA (HUDSON e STEINBERG, 1999; VAN SOEREN et al., 2000). A SDRA é uma síndrome clínica grave caracterizada por lesão pulmonar aguda decorrente de intensa inflamação pulmonar, onde se observa infiltrado de células inflamatórias, ruptura da barreira do epitélio alveolar e comprometimento da troca gasosa pulmonar. O que pode resultar em edema alveolar rico em proteínas, hipoxemia e vasoconstrição pulmonar (BURLESON et al., 2005; BERNARD, 2005).

A SDRA é uma síndrome devastadora, associada a índices de mortalidade superiores a 40%. Dada sua alta prevalência, cerca de 75 casos/100.000 habitantes/ano, o número de mortes por ano, somente nos EUA, chega a 80.000 (MARTIN, 2005; LEWANDOWSKI e LEWANDOWSKI, 2006). Como parâmetro de comparação, aproximadamente 50.000 pessoas morrem por ano de câncer de mama e 150.000 de câncer de pulmão nos EUA (MARTIN, 2005).

Embora possa ter início agudamente (6-48 horas após o insulto lesivo), a SDRA pode persistir por dias e até semanas (HUDSON et al, 1995). Inicialmente, apresenta uma fase denominada exsudativa, caracterizada pela liberação de amplo espectro de mediadores, congestão e expansão da parede alveolar, edema, presença de sangue nos alvéolos, lesão das células epiteliais do tipo I e do endotélio capilar alveolar. Num período mais tardio desta fase, conhecido como “pulmão de choque” observa-se colapso alveolar, hemorragia, edema, e acúmulo de neutrófilos nos capilares alveolares. Num curso natural da resposta inflamatória, advém a fase regenerativa, quando ocorre a recuperação do pulmão para sua estrutura normal. Neste período observa-se, por exemplo, infiltração de miofibroblastos e deposição de colágeno, proliferação das células epiteliais tipo II e crescimento de epitélio. Por fim, caso a lesão difusa alveolar não seja resolvida por meio da regeneração, instala-se a fase reparativa caracterizada por trombose local e remodelamento vascular (Figura 1) (LUCAS, 2007).

Figura 1. Perfil temporal do curso da SDR (GALHARDO e MARTINEZ, 2003)

O recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório é evento crítico para a defesa do hospedeiro contra estímulos lesivos e para a reparação tecidual (JANUSZ e DOHERTY, 1991). Em relação à SDR, neutrófilos recrutados podem também causar danos ao tecido pulmonar devido à liberação de amplo espectro de mediadores, de proteases e de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (GRISHAM et al., 1986). Muito embora os mecanismos determinantes da SDR ainda não estejam totalmente elucidados, é bem aceito que uma grande variedade de citocinas pró e antiinflamatórias que são detectadas no fluído e no sangue de pacientes que desenvolvem SDR sejam potenciais mediadores da lesão pulmonar (LESUR et al., 1999).

Além das citocinas, enzimas liberadas pelos neutrófilos são importantes indutores de lesão tecidual. Entre elas, a elastase e as metaloproteinases de matriz (MMPs) participam de forma significativa na fase efetora da SDR (PUNEET et al., 2005). A elastase é capaz de causar lesão do endotélio pulmonar e paralelamente participa da degradação de constituintes da matriz extracelular (MORAES et al., 2003). Assim, durante a ativação dos neutrófilos é razoável supor que elastina, colágeno e fibronectina sejam alvos das ações da elastase contribuindo, portanto, para a lesão da membrana basal pulmonar. Nesse contexto, é razoável supor que neutrófilos do leito vascular pulmonar de indivíduos com SDR liberem elastase, o que pode alterar a interação leucócito-endotélio. De fato, existem estudos indicando que o plasma e o lavado broncoalveolar de pacientes portadores de SDR apresentam aumento significativo dos níveis de elastase (GROENEVELD et al., 1995). Takayama et al. (2001) demonstraram redução da ativação de neutrófilos isolados da

vasculatura pulmonar de ratos submetidos à I/R intestinal pelo tratamento com o inibidor de elastase ONO-5046. De acordo com esses autores, a inibição da elastase pode constituir benefício na terapêutica da SDRA.

Como mencionado anteriormente, as metaloproteinases têm importante papel na patogênese e na evolução da SDRA (BITTERMAN, 1992; STARCKXN et al., 2002). Estudos demonstram que os níveis de MMP-2 e MMP-9 no lavado broncoalveolar de pacientes com SDRA, em comparação com indivíduos saudáveis, se encontram elevados na fase inicial da doença, enquanto a razão entre a MMP-9 e seu antagonista TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) se mantém elevada na fase tardia. (RICOU et al., 1996; TORRI et al., 1997). Os mesmos resultados foram obtidos por Pugin et al. (1996) quando compararam pacientes com SDRA a pacientes acometidos de edema pulmonar hidrostático. Além disso, pacientes com fibrose idiopática apresentam aumento da expressão de MMP-9 no lavado broncoalveolar, sugerindo que esta enzima pode participar do processo de remodelamento das vias aéreas associado à inflamação pulmonar (LEMJABBAR et al., 1999). Considerando o exposto, é aceitável admitir que a magnitude da lesão pulmonar observada na SDRA depende do grau de lesão na barreira epitélio-alvéolo. Assim, quanto mais precocemente se instalar o processo de reparo epitelial melhor será o prognóstico do paciente (BERTHIAUME et al, 1999). Como indicado na figura 1, a SDRA pode se estender por vários dias. Nessas condições ocorrem alterações na arquitetura pulmonar as quais podem constituir a fibrose pulmonar. Mediadores inflamatórios solúveis atingindo o interstício pulmonar estimulam fibroblastos e outras células produtoras de colágeno a migrarem, proliferarem ou produzirem excesso de colágeno. Portanto, a fibrose pode ser consequência direta dos efeitos dos mediadores inflamatórios na atividade funcional de fibroblastos. Ainda, a inflamação pulmonar pode estimular a síntese de mediadores pró-fibróticos. Alternativamente, a fibrose poderia ser decorrente de uma falha no balanço inibição/indução da geração de elementos da matriz extracelular.

Tendo em vista que eventos isquêmicos seguidos de reperfusão causam inflamação pulmonar e SDRA, e sendo a barreira alveolar constituída de capilares, membrana basal, matriz extracelular e epitélio alveolar, o estudo temporal da evolução do processo inflamatório pulmonar causado pela I/R intestinal pode ser útil para analisar o curso da inflamação e sua evolução para a reparação tecidual pulmonar.

1.3 Sistemas gastrintestinal, linfático e modulação da SDRA

Existem relatos de que alterações no sistema gastrintestinal estão envolvidas com a insuficiência múltipla de órgãos (IMOS) (MOORE et al., 1994). Desses estudos reconheceu-se que o funcionamento adequado do sistema gastrintestinal poderia ser bom prognóstico para pacientes internados em unidade de terapia intensiva. Entre os distúrbios gastrintestinais que afetam a circulação intestinal, a hipoperfusão ocupa lugar de destaque. Na medida em que a SDRA pode ser associada à IMOS (BIFFL e MOORE, 1996), então o intestino pode ser seu motor e conseqüentemente da injúria pulmonar aguda. Desta forma, a potencial geração de mediadores inflamatórios pelo intestino, quando este se encontra sob trauma, pode ser a base da SDRA.

Estudos realizados por Moore et al. (1994), mostraram que a I/R intestinal causa inflamação pulmonar, ativação intestinal de fosfolipase A₂ e recrutamento intestinal de neutrófilos. Do conjunto de dados obtidos com esse estudo os autores confirmaram que o intestino é gerador de mediadores inflamatórios, os quais modulam a injúria pulmonar aguda. Narita et al., (2004), mostraram redução da lesão microvascular pulmonar decorrente da I/R intestinal ao isolar o intestino do peritônio parietal. Estes autores observaram redução plasmática dos níveis de TNF- α , IL-1- β e IL-8 e concomitantemente, aumento dessas citocinas no fluido intestinal extravasado (ascite) coletado na bolsa plástica. Esses dados reforçam o conceito de que o intestino sob trauma é importante gerador de mediadores inflamatórios (JOHNSTON et al., 1993).

À luz dessas evidências, a questão que se coloca é de que forma os mediadores inflamatórios gerados no intestino atingem o pulmão? Neste contexto, existem estudos considerando que a disfunção pulmonar, a inflamação sistêmica e a IMOS causadas pelo trauma gastrintestinal decorrem dos efeitos dos mediadores inflamatórios provindos do intestino e drenados a partir do sistema linfático mesentérico (MAGNOTTI et al., 1998; DEITCH et al., 2001). Funcionalmente, o sistema linfático é composto por uma rede de vasos interconectados com órgão linfóides, como os linfonodos, baço e placas de Peyer no intestino delgado. O sistema linfático geralmente se encontra paralelo aos vasos sanguíneos, constituindo via de coleta e transporte de fluidos, proteínas do espaço intersticial, células do sistema imune, lipídeos, antígenos, enzimas e hormônios, permitindo assim o retorno do material coletado à circulação sistêmica (VON DER WEID e MUTHUCHAMY, 2009). Além disso, a linfa mesentérica é transportada através do ducto torácico até a veia subclávia

atingindo o pulmão (FANOUS et al., 2007) e contribuindo, assim, para a lesão pulmonar observada após a I/R intestinal.

De fato, dados obtidos pelo nosso grupo e aqueles descritos por Davidson et al. (2004) reforçam o conceito de que o intestino gera diversos mediadores inflamatórios que são drenados pelo sistema linfático mesentérico e atingem o pulmão. Davidson et al. (2004) em seu trabalho mostraram que a linfa mesentérica de ratos submetidos ao trauma seguido de choque hemorrágico causa morte de células endoteliais pulmonares por mecanismos associados a apoptose onde o TNF- α não está envolvido. Aliás, os estudos conduzidos por esses autores não revelaram a presença de IL-1 β , TGF- β , GMCSF e TNF- α na linfa mesentérica. Em contraste, estudos do nosso laboratório revelaram que na vigência de I/R intestinal, a linfa é rica em TNF- α e que a ligação do ducto linfático torácico, além de reduzir a inflamação pulmonar, diminui os níveis deste mediador no soro e reduz o aumento de permeabilidade vascular intestinal (CAVRIANI et al., 2005). Posteriormente mostramos perfil similar nos níveis de IL-1 β e IL-10 no soro dos animais após obstrução do ducto linfático torácico (CAVRIANI et al., 2007). Também mostramos que a I/R intestinal gera IL-1 β no pulmão e esta induz a geração de NO que se associa a redução da contratilidade à metacolina (COELHO et al., 2007). Neste mesmo modelo mostramos ainda que o bloqueio da geração de NO, eleva os níveis linfáticos de IL-6 e que esta citocina reduz a expressão de PECAM-1 no pulmão (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009). É interessante notar que em estudos anteriores mostramos que o bloqueio da geração de NO exacerba as lesões pulmonares causadas pelas I/R intestinal (CAVRIANI et al., 2004).

O sistema linfático também está relacionado com a resposta imune adaptativa. Ele é responsável pelo transporte de antígenos a tecidos linfóides permitindo o início da resposta imune. Células imunes, fluidos, bactérias, vírus e seus produtos chegam aos linfonodos por meio do sistema linfático ou através do sistema cardiovascular. Os antígenos presentes na linfa quando alcançam os linfonodos ativam células T e B naïve residentes (VON DER WEID e MUTHUCHAMY, 2009).

Uma vez que mediadores inflamatórios podem estar presentes na linfa após a I/R intestinal, é razoável supor que o perfil de liberação destes mediadores na linfa possa se alterar ao longo dos dias de reperfusão intestinal.

1.4 Inflamação e angiogênese

A considerar os eventos vasculares da resposta inflamatória, como a interação leucócito-endotélio, é razoável supor que o organismo acione mecanismos reguladores a fim de dimensionar a resposta inflamatória, ofertando base para que o processo de reparo e manutenção da homeostasia seja construído.

Existem inúmeros estudos indicando que as células endoteliais, em adição aos seus efeitos como barreira física protetora da vasculatura (GALLEY e WEBSTER, 2004), exercem importante efeito metabólico (HACK e ZEERLEDER, 2001). De fato, estas células sintetizam mediadores cujos efeitos sobre o tônus da musculatura lisa vascular e na permeabilidade microvascular são bem documentados. Ainda, o endotélio vascular é importante fonte de PGI₂, NO, proteínas de matriz (laminina, fibronectina, colágeno etc), fatores da coagulação (fator V, TBA₂, PAF, vWf), fatores de crescimento (TGF, CSF) e mediadores inflamatórios (leucotrienos, interleucinas) (GALLEY e WEBSTER, 2004). Tais mediadores exercem efeito regulador no recrutamento celular, coordenando a interação dos leucócitos com o endotélio (RHEE et al., 2003). Diversas moléculas participam desta interação, dentre elas as selectinas (L-selectina, E-selectina, P-selectina), as integrinas (subunidades α e β) e as imunoglobulinas (ICAM-1 e 2, VCAM-1 e PECAM-1).

Durante a interação leucócito-endotélio, a PECAM-1 medeia o aumento da superfície de contato da célula endotelial, modifica a conformação do citoesqueleto, ou induz a própria expressão gênica (COOK-MILLS e DEEM, 2005; FUJIWARA, 2006). Deste modo, esta molécula medeia o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, vasculogênese, angiogênese, regulação da ativação de neutrófilos, monócitos e células T e fagocitose (DELISSER et al., 1997; ELIAS et al., 1998). Recentemente, mostramos que a I/R intestinal aumenta a expressão de PECAM-1 no pulmão e que, possivelmente, esta molécula esteja associada aos efeitos lesivos dos neutrófilos sobre o pulmão (BREITHAUP-T-FALLOPA et al., 2009). Estudos anteriores do nosso grupo revelaram também aumento na expressão de anexina I e de ICAM-1 no pulmão de ratos submetidos à I/R intestinal (CAVRIANI, 2007).

Outro evento importante na resposta inflamatória é o aumento da permeabilidade vascular local, que também é desencadeado pelo processo de angiogênese. Tal aumento de permeabilidade se associa ao acúmulo de fibrina no interstício, formando a matriz extracelular provisória, a qual, uma vez constituída, é essencial para a migração das células endoteliais (FRIEDL et al., 2002). A angiogênese é modulada por mediadores com ação

estimulatória e inibitória. Dentre os fatores estimuladores da angiogênese podemos citar, VEGF, β FGF, EGF, PDGF, MMPs, PlGF e angiopoitinas (FERRARA, 2002), componentes da matriz extracelular (fibronectina, vitronectina e colágeno) e receptores celulares (integrinas como $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$) (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2006; CHAVAKIS et al., 2004; PATAN, 2004; SOTTILE, 2004).

A deposição de fibrina, assim como a exposição do endotélio a níveis elevados de histamina e trombina induzem a liberação do antígeno do fator de von Willebrand (vWf). (RIBES et al., 1987), um dos principais antígenos presentes nas células endoteliais (WAGNER et al., 1986). O vWf é uma glicoproteína plasmática com propriedade coagulante agindo sobre a agregação plaquetária. A expressão do vWf é exclusiva de células endoteliais e de megacariócitos, fato que pode ser importante no estudo da caracterização dessas células (MICHAUX e CUTLER, 2004). Todavia, o vWf somente é armazenado nas células endoteliais em grânulos citoplasmáticos denominados “corpos de Weibel-Palade”. Quando solúvel no plasma, o fator vWf é encontrado associado com o fator VIII da coagulação (HANNAH et al., 2002). Diversos estudos demonstram que o antígeno vWf pode ser utilizado como marcador de lesão endotelial. Além disso, elevados níveis plasmáticos deste antígeno têm sido encontrados em adultos e crianças com inflamação pulmonar aguda e SDRA (WARE et al., 2004; SIEMIATKOWSKI et al., 2001; SABHARWAL et al., 1995).

É interessante lembrar que a dinâmica básica do desenvolvimento da angiogênese, recrutamento e ativação celular, aumento de permeabilidade vascular, produção de mediadores pró e antiinflamatórios recapitulam alguns eventos normalmente observados durante a resposta inflamatória. Neste contexto, é possível estabelecer um paralelo entre os fenômenos e mecanismos reguladores de ambos os processos.

1.5 Reparação tecidual

Durante o curso da SDRA, o espraçamento e a migração celular constituem o mecanismo primário da fase precoce onde se desenvolve o reparo alveolar epitelial. A reparação tecidual é caracterizada por três fases interligadas e sobrepostas: inflamação, estabilização (formação tecidual) e remodelação. É um processo dinâmico que envolve a interação de diferentes tipos celulares, que variam de acordo com o tipo de tecido envolvido. Na reparação tecidual ocorre a participação de fatores de crescimento e citocinas que

controlam e regulam a participação coordenada das células e da matriz extracelular, visando à completa regeneração tecidual (GEISER, 2003).

O exemplo mais estudado de reparo é aquele que se segue a uma lesão na pele (SINGER e CLARK, 1999). Inicialmente, a ferida é preenchida por um coágulo sanguíneo responsável pelo restabelecimento da homeostase e que serve como uma matriz provisória de fibrina para migração das células adjacentes. As células, predominantemente plaquetas ativadas, liberam mediadores como o PDGF que levam a instauração do processo inflamatório através do recrutamento e ativação de macrófagos e fibroblastos.

De forma geral, a vasculatura e o estabelecimento de sua circulação são a base estrutural para a reparação tecidual (KLEINHEINZ et al., 2002). As células endoteliais, estimuladas por fatores angiogênicos como VEGF e FGF, são responsáveis pela neovascularização na área lesada proliferando e formando novos vasos no tecido de granulação. Os componentes da matriz extracelular exercem papel fundamental na neovascularização. Uma matriz de fibronectina, fibrina e outros componentes norteia as células endoteliais para a formação dos novos vasos (CARMELIET, 2004). A angiogênese na reparação é indispensável, proporcionando nutrição para a contínua formação tecidual.

Fibroblastos também são determinantes na formação do novo tecido. Após migrarem para o sítio lesado sintetizam nova matriz formada principalmente por colágeno. Nesta fase de formação tecidual, várias metaloproteinases de membrana (MMPs) atuam degradando a matriz preexistente e criando as condições para a migração celular (MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001). As metaloproteinases são uma família de endopeptidases dependentes de zinco, essenciais para a degradação e remodelação da matriz extracelular (ECM) durante processos infecciosos, inflamação, reparo e angiogênese (PARKS e SHAPIRO, 2001; WU et al., 2001). As gelatinases, MMP-2 e MMP-9 são enzimas que degradam colágeno do tipo IV, componente principal das membranas basais, e são consideradas mediadores importantes da resposta inflamatória (GANEVA et al., 2007). Células inflamatórias exercem algumas de suas funções mediadas pelas MMPs liberadas no sítio inflamatório contribuindo para o *clearance* de agentes estranhos. Todavia, quando em excesso, as MMPs podem destruir a matriz extracelular do ambiente, romper as células residentes e exacerbar a inflamação (TETLEY, 1993). Assim, não é surpreendente que as MMPs estejam implicadas na indução da lesão pulmonar aguda observada na inflamação sistêmica, sepse e aquela induzida por citocinas (OKAMOTO et al., 2004). Embora várias células pulmonares possam expressar MMPs, em circunstâncias inflamatórias, elas são sintetizadas principalmente por neutrófilos e macrófagos (CORBEL et al., 2000). Níveis elevados de MMPs são encontrados no lavado

broncoalveolar de pacientes portadores de SDRA (RICOU et al., 1996; CORBEL et al., 2000). Esses pacientes têm *turnover* aumentado de matriz extracelular, caracterizado pelo aumento da degradação dos produtos de colágeno tipo IV, bem como dos marcadores de sua síntese (CLARK et al., 1995). Todavia, o papel das metaloproteínases na lesão pulmonar decorrente de trauma esplâncnico, como na isquemia intestinal, ainda não foi consistentemente avaliado. Recentes estudos indicam que as metaloproteínases podem ativar, inativar ou antagonizar citocinas, quimiocinas (MCQUIBBAN et al., 2002) e outras proteínas que regulam diversos aspectos da inflamação e da imunidade (PARK et al., 2004).

A fase de remodelação é responsável pela transição entre o tecido de granulação, rico em colágeno e vasos, e o tecido com as mesmas características do tecido perdido, sendo caracterizada pela diminuição no número de células e vasos por meio do processo de apoptose (DESMOULIÈRE et al, 1995).

A análise da morfologia pulmonar na SDRA reflete a evolução do edema intersticial e alveolar em direção ao estágio final da fibrose unidade alvéolo-capilar. Admite-se que mediadores solúveis atingindo o interstício pulmonar estimulem fibroblastos e outras células produtoras de colágeno a migrar, proliferar ou produzir excesso de colágeno. Portanto, a fibrose pode ser consequência direta dos efeitos dos mediadores sobre a atividade funcional dos fibroblastos ou de mediadores pró-fibróticos sintetizados como consequência da estimulação do evento inflamatório pulmonar. Alternativamente, a fibrose poderia ser decorrente de falha no balanço entre inibição/indução da geração de elementos da matriz extracelular. (BERTHIAUME et al, 1999).

O envolvimento da vasculatura é importante aspecto da SDRA desde a fase inicial de indução de edema até a hipertensão pulmonar. É possível portanto, que as lesões vasculares observadas na SDRA, possam ser de maior ou menor magnitude, na dependência do estado funcional de neutrófilos aderidos ao endotélio, bem como da ação de mediadores liberados para contrapor as ações lesivas dos estímulos inflamatórios. Nesse contexto, é razoável admitir que a base do mecanismo de reparo epitelial pode estar sob controle da interação de células inflamatórias e endotélio. Vale lembrar também que evidências da década de 80 indicam que na injúria pulmonar decorrente de trauma, observa-se o aparecimento de um processo de remodelação envolvendo a maioria dos componentes do tecido pulmonar (NERLICH et al., 1984).

No que tange as alterações da matriz extracelular pulmonar após a I/R intestinal, é importante considerar os mecanismos modulares da reparação tecidual pulmonar. É interessante observar que são poucos os estudos que se ocupam da análise do endotélio,

sendo interessante avaliar a relevância do tipo de estímulo e do estado de ativação endotelial para o desencadeamento do processo de reparação tecidual após a I/R intestinal.

Diante do exposto, o presente estudo visa investigar os mecanismos reguladores da resposta inflamatória pulmonar decorrente de isquemia intestinal seguida de períodos prolongados de reperfusão. Tendo como base a hipótese do intestino como motor da inflamação pulmonar, a participação do sistema linfático na modulação da inflamação pulmonar também foi avaliada.

2 Objetivos

- Caracterizar a inflamação pulmonar causada pela I/R intestinal após períodos prolongados de reperfusão.
- Investigar se o sistema linfático modula a inflamação pulmonar após distintos períodos de reperfusão intestinal.
- Quantificar mediadores inflamatórios e antiinflamatórios na linfa de animais submetidos à I/R intestinal.
- Avaliar o efeito de períodos prolongados de reperfusão intestinal sobre a geração pulmonar de mediadores inflamatórios.
- Analisar o grau de lesão do endotélio pulmonar ao longo dos períodos de reperfusão intestinal avaliados por meio de estudos imuno-histoquímicos.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (220-250g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos tiveram livre acesso à ração e água. Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº80/05/CEEA).

3.2 Indução da isquemia e reperfusão intestinal

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (10% - 400 mg/kg) e após laparotomia mediana, a artéria mesentérica superior foi obstruída por 45 min utilizando-se uma pinça vascular de micro-cirurgia (“Vascu-statt” nº 1001-531, Scalan International). Paralelamente, alguns animais, previamente à realização do processo de isquemia intestinal, tiveram o ducto linfático torácico bloqueado com fio de algodão (SUDO e LEME, 1980). Durante o período de manutenção da isquemia, o abdômen dos animais foi mantido coberto com plástico transparente (15 cm x 10 cm) para minimizar perdas de líquido e de calor causadas pela incisão abdominal. Decorrido o tempo desejado de isquemia intestinal, a pinça vascular foi retirada e a incisão mediana fechada com sutura contínua, em dois planos, com fio de algodão monofilamentar. Após a sutura, os animais receberam uma dose de cloridrato de tramadol (5 mg/kg – i.m.) e foram mantidos em reperfusão intestinal por períodos de 24, 72 ou 120 horas. Como controle foram utilizados ratos submetidos aos mesmos procedimentos do grupo de isquemia/reperfusão intestinal (I/R), excetuando-se o pinçamento vascular (grupo sham). Um terceiro grupo foi constituído de animais não manipulados (grupo basal).

Figura 2. Esquema de indução da isquemia e reperfusão intestinal

3.3 Avaliação da repercussão pulmonar e intestinal induzida pela I/R intestinal

3.3.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Após a I/R intestinal, os animais foram submetidos a eutanásia, sob anestesia profunda (hidrato de cloral > 400 mg/kg – i.p.), por dessangramento da aorta abdominal. O leito vascular pulmonar foi perfundido pela artéria pulmonar com 20 ml de PBS. Fragmentos de intestino e pulmão foram retirados e pesados e a eles adicionado 1 ml de tampão fosfato pH 6 contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - 0,5%) e 5 mM de EDTA. A seguir as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tecidual (Medic Tools®) durante 20 segundos. As amostras foram centrifugadas a 12.500 rpm durante 10 minutos à temperatura de 4° C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade de MPO. O ensaio de MPO foi conduzido adicionando-se, em duplicata, 10 µl da amostra em placas plásticas de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão substrato, contendo tampão fosfato pH 6, peróxido de hidrogênio (0,1%) e orto-dianisidina (1,25%). Decorridos 5 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 50 µl de azida sódica (1%). A leitura da absorbância foi feita em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda de 450 nm e os valores de absorbância expressos como atividade de MPO/mg de tecido.

3.3.2 *Avaliação da permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal*

A quantificação da permeabilidade vascular foi feita por meio da técnica de determinação da concentração do corante azul de Evans (AE) extravasado de fragmentos de pulmão e intestino (SIROIS et al., 1988). Para tanto, 25 mg/kg do corante foram injetados por via intravenosa 20 minutos antes do tempo da reperusão intestinal ser completado. Após a eutanásia, o leito vascular pulmonar foi perfundido com PBS pela artéria pulmonar para remoção do sangue intravascular. A seguir, fragmentos dos tecidos foram removidos, limpos e pesados. Um fragmento de cada tecido foi colocado em formamida (4 ml/g, a 20° C por 24 h), enquanto a outra porção foi mantida em estufa a 37° C por 72 h para determinação posterior do peso seco dos tecidos. A densidade óptica (DO) foi obtida em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda 620 nm. A concentração de AE das amostras foi determinada cotejando os valores de DO em curva padrão. Os valores foram expressos em µg de AE/g de peso seco dos fragmentos de pulmão e intestino.

3.4 *Canulação do ducto linfático torácico e obtenção da linfa*

Decorrido os tempos determinados de reperusão intestinal (24, 72 ou 120 h), os animais tiveram o ducto linfático torácico canulado para obtenção da linfa. A linfa foi coletada por um período de 1 h após o término da reperusão intestinal. Para tanto, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg – i.p.), após laparotomia abdominal as vísceras foram afastadas para a localização do ducto linfático torácico, onde foi feita a canulação com tubo sylastic (0,06 cm de diâmetro e 0,1 cm de diâmetro externo) previamente preenchido com solução de heparina (500 UI/ml). A seguir, a cânula foi amarrada com fio de algodão no ponto de inserção do ducto torácico linfático e sobre a massa muscular da parede abdominal posterior. A incisão foi suturada de forma contínua, em dois planos, com fio de algodão monofilamentar. Após a cirurgia foram administrados 100 µl de solução de heparina (50 UI/ml) e 1 ml de solução salina por via subcutânea. Os animais foram mantidos em caixas de Bollman e receberam água e comida sem restrições. A linfa foi coletada em microtubos com 50 µl de solução de heparina (500 UI/ml) e posteriormente centrifugada em 1.500 rpm por 5 min, as células separadas e o sobrenadante armazenado em freezer – 80° C.

3.5 Cultura de tecido pulmonar (explante)

Após a eutanásia, o leito vascular pulmonar dos animais foi perfundido com 20 ml de PBS através de uma cânula inserida na artéria pulmonar. De cada animal foram obtidos 12 fragmentos de pulmão de tamanho homogêneo (aproximadamente 2x2 mm) que foram cultivados por 24 h em placa de 24 poços (4 fragmentos por poço) em 1 ml de meio DMEM contendo 0,5% de penicilina/estreptomicina a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e armazenado em freezer -80° C para posterior determinação de mediadores inflamatórios. Os fragmentos pulmonares foram colocados em estufa por 72 h à 37° C para determinação de seu peso seco.

3.6 Determinação de mediadores inflamatórios

Amostras de linfa e do meio de cultura dos explantes pulmonares foram utilizadas para quantificação dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e VEGF, utilizando-se “kits” comerciais Duo Set (R&D System®). Os ensaios foram conduzidos segundo especificações do fabricante e a densidade óptica obtida em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda de 450 nm. Além destes mediadores, os níveis de leucotrieno B₄ (LTB₄) também foram determinados nas alíquotas de linfa e de explante pulmonar, utilizando-se “kits” para ensaio imunoenzimático (Cayman Chemical®). Os ensaios foram conduzidos segundo as instruções do fabricante e a densidade óptica obtida em leitor de ELISA (Bio-Tek Instruments®) em comprimento de onda de 420 nm.

Os resultados foram expressos em pg/ml/mg de tecido pulmonar seco no caso das amostras de explante pulmonar e em pg/ml no caso das amostras de linfa.

3.7 *Análise hematológica*

Decorrido o tempo de reperfusão intestinal, os animais foram anestesiados e amostras de sangue (300 µl) foram coletadas da artéria aorta abdominal. Estas amostras foram colocadas em microtubos contendo 10 µl de EDTA (5%). O número de leucócitos totais, granulócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas e também o hematócrito foram obtidos. Para tanto, utilizamos um analisador hematológico (ABC Vet - Horiba ABX Brasil). Estes estudos foram conduzidos sob coordenação da Prof^a Dr^a Primavera Borelli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas da Universidade de São Paulo.

3.8 *Análise histológica e imuno-histoquímica do tecido pulmonar*

Após a I/R intestinal e eutanásia a cavidade torácica dos animais foi aberta e o leito vascular perfundido com 20 ml de PBS. A seguir, os pulmões foram preenchidos, pela traquéia, com 10 ml de TFM (*Tissue Freezing Medium*, Leica Instruments), diluído 1:3 em água destilada. A traquéia foi ocluída e o conjunto traquéia-pulmão removido. O lóbulo pulmonar esquerdo foi retirado, mergulhado em hexano acondicionado em gelo seco e processado para obtenção de cortes (8 µm) em creostato. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas e subsequentemente fixados em acetona por 10 min. As lâminas foram lavadas com TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*), durante 10 min por 2 vezes. Posteriormente, foram permeabilizadas com Triton-X diluído em TBS-T (2 x de 5 min), lavadas com TBS-T por 2 vezes de 5 min. e imersas, durante 30 min., em solução de peróxido de hidrogênio (2%) à temperatura ambiente para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. A seguir, foram realizadas 2 lavagens com TBS-T e posteriormente, o bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos utilizando BSA (10%, 30 min). Os seguintes anticorpos primários foram incubados por 24 h em câmara úmida à 4° C: anti-PECAM-1, anti-vWf, anti-VE-caderina (Chemicon International®), anti-fibronectina, anti-integrina β_1 (Santa Cruz Biotechnology®), anti-colágeno tipo I e anti-colágeno tipo IV (Abcam ®), diluídos em TBS-T/BSA (1:500).

No dia seguinte, após três lavagens com TBS-T e sob proteção de luz, os cortes foram incubados por 2 h com os anticorpos secundários (1:250) conjugados à peroxidase (HRP) em temperatura ambiente. Após esta incubação as lâminas foram lavadas três vezes com TBS-T e 3 gotas do substrato AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole - Biogenex®) foram adicionadas e mantidas por 4 minutos em contato com os cortes. Os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina. As lâminas foram montadas com meio de montagem aquoso.

A análise dos cortes foi realizada utilizando-se microscópio óptico comum (Nikon Eclipse E600) acoplado à câmera digital (Nikon Digital Sight DS-SM) e ao computador. As imagens foram analisadas por meio do software Image J (RSB - v. 1.42) pela intensidade de coloração.

3.9 Tratamento farmacológico

Os animais foram tratados com antibiótico de amplo espectro (Pentabiótico® - 1 ml/kg, i.m.) em distintos períodos da indução da I/R intestinal e a inflamação pulmonar avaliada 120 h após o início da reperfusão intestinal. O esquema de tratamento segue o protocolo abaixo. Foram avaliadas a atividade da enzima mieloperoxidase e a permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal.

- 1 - Sem tratamento
- 2 - T₁ - Tratamento 1 h antes da indução da I/R intestinal
- 3 - T₂ - Tratamento imediatamente após o término da isquemia intestinal
- 4 - T₃ - Tratamento após 1 h do início da reperfusão intestinal
- 5 - T₄ - Tratamento após 96 h do início da reperfusão intestinal

3.10 *Análise Estatística*

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste Tukey. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o Software GraphPad Prism v 5.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Caracterização dos efeitos da I/R intestinal sobre o pulmão e o intestino

4.1.1 Atividade de MPO

4.1.1.1 Pulmão

Os dados da figura 3 representam a infiltração de neutrófilos, quantificada indiretamente por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), para o pulmão de animais submetidos a I/R intestinal com luxo linfático intacto ou não.

Após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal (painéis A e B, respectivamente), observamos que a I/R intestinal não alterou a atividade de MPO pulmonar em relação ao grupo basal. Em contrapartida, quando analisamos o painel C, notamos que após 120 h de reperfusão intestinal houve aumento significativo da atividade de MPO pulmonar nos animais do grupo I/R intestinal com ducto linfático intacto em relação ao grupo basal.

A análise geral dos efeitos dos diferentes tempos de reperfusão intestinal (painel D) revelou que após 120 h de reperfusão intestinal houve aumento na atividade de MPO pulmonar nos animais com o ducto linfático intacto em relação aos animais submetidos a 72 h de reperfusão intestinal também com o ducto linfático intacto.

Figura 3. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de pulmão. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos à isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϵ P 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto.

4.1.1.2 Intestino

Em relação ao intestino, nossos dados mostraram que a I/R intestinal não alterou a atividade de MPO em nenhum dos tempos de reperfusão intestinal investigados. A obstrução do fluxo linfático também não modificou a MPO intestinal após a I/R intestinal (Figura 4)

Figura 4. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de intestino. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$

4.1.2 Extravasamento do corante Azul de Evans

4.1.2.1 Pulmão

A permeabilidade vascular no pulmão dos animais submetidos a I/R intestinal está representada na figura 5.

Nos painéis A (24 h de reperfusão intestinal) e B (72 h de reperfusão intestinal) não observamos diferença significativa no extravasamento do corante azul de Evans no parênquima pulmonar dos animais I/R intestinal, com ducto linfático intacto ou bloqueado em relação aos animais do grupo basal e seu respectivo grupo sham. Por outro lado, os dados apresentados no painel C indicam aumento significativo do extravasamento do corante no pulmão dos animais submetidos a 120 h de reperfusão intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado quando comparados com o grupo basal. Este aumento no grupo I/R intestinal com ducto intacto também foi significativamente maior que o observado em seu respectivo grupo sham. Além disso, o bloqueio do ducto linfático nos animais I/R intestinal atenuou significativamente o extravasamento do corante azul de Evans quando comparado ao obtido em animais submetidos a I/R intestinal, porém, com o ducto linfático torácico intacto.

Quando comparamos o extravasamento do corante nos diferentes períodos de reperfusão intestinal (Figura 5D), notamos que após 120 h de reperfusão intestinal, com ou sem ducto linfático intacto, houve aumento significativo do extravasamento protéico pulmonar em relação aos períodos anteriores de reperfusão intestinal.

Figura 5. Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) pulmonar. A determinação da PV foi feita através da quantificação de azul de Evans extravasado do parênquima. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* I/R ducto intacto; λP I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado; ϕP 24h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; ϵP 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; τP 24h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado; ωP 72h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado; δP 120h ducto intacto *versus* 120h ducto bloqueado.

4.1.2.2 Intestino

O efeito da I/R intestinal sobre o extravasamento protéico no duodeno está representada na figura 6. Como pode ser observado nos painéis A e B, após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal, a I/R intestinal não alterou a permeabilidade vascular intestinal e a obstrução do fluxo linfático não modificou estes valores. Por outro lado, podemos notar que após 120 h de reperfusão intestinal (painel C) houve aumento significativo da permeabilidade vascular intestinal nos animais do grupo I/R e sham com ducto linfático intacto em relação à permeabilidade observada nos animais do grupo basal.

Analisando temporalmente os efeitos da I/R intestinal (painel D), observamos que os animais com fluxo linfático intacto e submetidos a 120 h de reperfusão intestinal apresentaram aumento significativo da permeabilidade vascular intestinal em relação aos animais reperfundidos por 24 h e 72 h. Já no grupo de animais com o ducto linfático obstruído, notamos aumento significativo no extravasamento do corante azul de Evans no intestino dos animais reperfundidos por 120 h de reperfusão em relação aos animais submetidos a 24 h de reperfusão.

Figura 6. Efeito da I/R intestinal sobre a permeabilidade vascular (PV) intestinal. A determinação da PV foi feita através da quantificação de azul de Evans extravasado. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP 24h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; ϵP 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; τP 24h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado.

4.2 Efeito da I/R intestinal sobre a geração de mediadores inflamatórios

4.2.1 Amostras de linfa

A figura 7 representa os dados obtidos com a quantificação de IL-1 β , IL-6, VEGF e LTB₄ em amostras de linfa coletadas de animais submetidos a I/R intestinal com distintos períodos de reperfusão (24 h, 72 h e 120 h).

Os dados apresentados no painel A representam os níveis de IL-1 β e indicam que a I/R intestinal, em todos os períodos de reperfusão estudados, promoveu aumento significativo nos níveis desta citocina na linfa em comparação com a linfa coletada de animais basais. Observamos também que após 72 h de reperfusão intestinal os níveis de IL-1 β diminuíram significativamente em relação aos valores encontrados após 24 h e voltaram a aumentar após 120 h de reperfusão intestinal.

Com respeito a IL-6, observamos aumento significativo e constante dos seus níveis na linfa em todos os períodos de reperfusão intestinal estudados em relação à linfa coletada de animais basais.

Os dados apresentados no painel C indicaram aumento de VEGF na linfa em todos os períodos de reperfusão intestinal. Observamos também que os níveis de VEGF após 72 h e 120 h de reperfusão intestinal foi significativamente menor que o encontrado após 24 h de reperfusão intestinal.

Por fim, os níveis de LTB₄ (painel D) aumentaram 24 h após a reperfusão intestinal e retornaram aos valores basais nos períodos subsequentes de estudo (72 e 120 h).

Figura 7. Quantificação de IL-1 β , IL-6, VEGF e LTB $_4$ na linfa de animais submetidos à I/R intestinal. Os animais foram submetidos a 45 min de isquemia intestinal e diferentes períodos de reperusão (24h, 72h, 120h). Decorrido os tempos desejados de I/R intestinal os animais foram anestesiados e o ducto linfático torácico canulado para obtenção da linfa. Os valores basais representam as amostras coletadas em animais não submetidos à I/R intestinal. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕ 24h versus 72h e 120h; ϵ 72h versus 120h.

4.2.2 Sobrenadante de explante pulmonar

4.2.2.1 IL-1 β

A figura 8 representa a concentração de IL-1 β em amostras de sobrenadante de explante pulmonar de animais submetidos à I/R intestinal.

Os dados representados no painel A indicam aumento significativo dos níveis de IL-1 β no explante pulmonar de animais submetidos à I/R intestinal 24 h com o ducto linfático intacto ou bloqueado em relação aos seus respectivos grupos sham e basal. Observamos ainda que o bloqueio do ducto linfático promoveu aumento significativo nos níveis desta citocina nos animais I/R intestinal quando comparados com os animais do mesmo grupo com o ducto linfático intacto.

Os valores de IL-1 β obtidos em explantes de animais I/R e sham 72 h (painel B) aumentaram significativamente quando comparados com os valores do grupo basal. Todavia, os níveis desta citocina no explante do grupo I/R não diferiram em relação aos níveis do grupo sham. Além disso, o bloqueio do ducto linfático no grupo sham ocasionou aumento de IL-1 β no explante pulmonar destes animais em relação ao grupo com o ducto linfático íntegro.

Com respeito ao período de 120 h de reperfusão intestinal (painel C) notamos que os animais I/R intestinal e sham apresentaram aumento nos níveis de IL-1 β no sobrenadante de explante pulmonar quando comparados com o grupo basal. Observamos ainda que o aumento de IL-1 β no explante pulmonar dos animais do grupo I/R com ducto linfático intacto foi significativamente maior que o observado em seu respectivo grupo sham.

Quando comparamos somente os animais submetidos à isquemia intestinal e a diferentes períodos de reperfusão (Fig. 8D) notamos que os níveis de IL-1 β nos animais como ducto linfático intacto aumenta significativamente ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados. Já nos animais com o ducto linfático bloqueado notamos que os níveis desta citocina no explante dos animais reperfundidos por 120 h são maiores que o observado após 24 h de reperfusão intestinal.

Figura 8. Quantificação de IL-1β em sobrenadante de explante pulmonar. Após os períodos desejados de reperfusão intestinal fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 24h e posteriormente o sobrenadante foi recolhido para determinação de citocinas. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperfusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; λP I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado; ϕP 24h ducto intacto *versus* 24h ducto bloqueado; ϵP 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; τP 24h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado; δP 120h ducto intacto *versus* 120h ducto bloqueado.

4.2.2.2 IL-6

Também foram quantificados os níveis de IL-6 no sobrenadante de explante pulmonar (Fig. 9). Como pode ser observado, a manipulação dos animais, e a I/R intestinal, promoveram aumento de IL-6 no explante pulmonar em todos os períodos de reperfusão intestinal investigados (painéis A, B, C).

A análise geral dos efeitos da I/R intestinal em distintos períodos de reperfusão revelou que o aumento dos níveis de IL-6 no explante pulmonar em relação aos valores basais não se alterou ao longo dos períodos estudados (painel D).

Figura 9. Quantificação de IL-6 em sobrenadante de explante pulmonar. Após os períodos desejados de reperusão intestinal fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 24h e posteriormente o sobrenadante foi recolhido para determinação de citocinas. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal.

4.2.2.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

A figura 10 representa os valores de VEGF obtidos em explantes de pulmão de animais submetidos à isquemia intestinal com o ducto linfático intacto ou não. No painel A notamos que após 24 h de reperfusão intestinal os níveis de VEGF no explante pulmonar dos animais I/R com ducto intacto não diferiram do encontrado no grupo basal. Já o bloqueio do ducto linfático neste mesmo grupo promoveu aumento de VEGF em relação aos valores basais, aos valores apresentados pelo seu respectivo grupo sham e também em relação ao grupo I/R com ducto intacto.

No painel B observamos que com 72 h de reperfusão intestinal não houve alteração dos níveis de VEGF no grupo I/R em relação ao grupo basal. Já no painel C notamos aumento significativo nos níveis de VEGF no grupo I/R 120 h com ducto linfático intacto em relação aos animais do grupo basal, mas não em relação ao seu grupo sham. Além disso, o bloqueio do ducto linfático causou redução dos níveis deste mediador no explante pulmonar dos animais sham e I/R.

No painel D observamos que nos animais com o ducto linfático intacto, os níveis de VEGF após 120 h de reperfusão intestinal foram significativamente maiores que os encontrados no explante pulmonar dos animais reperfundidos por 24 h e 72 h. Notamos ainda que após 72 h de reperfusão intestinal, os animais com o ducto linfático bloqueado apresentaram redução nos níveis de VEGF em relação aos animais submetidos a 24 h de reperfusão intestinal.

Figura 10. Quantificação de VEGF em sobrenadante de explante pulmonar. Após os períodos desejados de reperusão intestinal fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 24h e posteriormente o sobrenadante foi recolhido para determinação de citocinas. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; λP I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado; ϕP 24h ducto intacto *versus* 24h ducto bloqueado e 120h ducto intacto; τP 24h ducto bloqueado *versus* 72h ducto bloqueado, ϵP 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; δP 120h ducto intacto *versus* 120h ducto bloqueado.

4.2.2.4 Leucotrieno B₄ (LTB₄)

Na figura 11A observamos que a I/R intestinal aumentou significativamente os níveis de LTB₄ no explante pulmonar em relação aos valores do grupo basal. O mesmo foi observado no grupo sham com ducto intacto. Já o bloqueio do ducto no grupo sham, mas não no grupo I/R, preveniu este aumento.

A figura 11B mostra que tanto o grupo I/R quanto o grupo sham com ducto intacto apresentaram aumento significativo dos níveis de LTB₄ no explante em relação aos valores basais. Porém, o aumento apresentado pelo grupo sham foi significativamente maior que o observado no grupo I/R. Notamos ainda que o bloqueio do ducto nos grupos sham e I/R intestinal reduziu os níveis deste eicosanóide.

No painel C observamos que 120 h após a reperusão intestinal houve aumento significativo nos níveis de LTB₄ no explante dos animais dos grupos I/R intestinal e sham, com ducto linfático intacto ou bloqueado, em relação ao observado no grupo basal. Além disso, o aumento apresentado pelo grupo sham foi significativamente maior que o observado em seu respectivo grupo I/R e o bloqueio do ducto linfático neste grupo reduziu os níveis deste eicosanóide quando comparado com os valores do grupo com o ducto linfático íntegro.

A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal (Fig. 11D) no grupo de animais com ducto obstruído revelou que após 72 h de reperusão intestinal houve redução dos níveis de LTB₄ no explante pulmonar destes animais em relação aos valores apresentados pelos animais submetidos a 24 h de reperusão intestinal. Em relação aos animais I/R intestinal com o ducto linfático intacto não observamos alterações nos níveis de LTB₄ ao longo dos períodos de reperusão intestinal estudados.

Figura 11. Quantificação de LTB₄ em sobrenadante de explante pulmonar. Após os períodos desejados de reperusão intestinal fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 24h e posteriormente o sobrenadante foi recolhido para determinação de mediadores inflamatórios. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; τP 24h ducto bloqueado *versus* 72h ducto bloqueado

4.2.2.5 IL-10

A concentração de IL-10 detectada em sobrenadante de explante pulmonar de animais submetidos (ou não) a I/R intestinal com o ducto linfático intacto ou bloqueado está representada na figura 12. No painel A podemos observar que a I/R intestinal após 24 h aumentou os níveis de IL-10 no explante pulmonar em relação aos níveis encontrados nos animais do grupo basal. No grupo sham com ducto intacto houve aumento nos níveis de IL-10 no explante pulmonar dos animais em relação aos valores basais e em relação ao seu respectivo grupo I/R. Porém, o bloqueio do ducto linfático neste grupo reverteu este aumento.

Os dados representados no painel B (72 h de reperfusão intestinal) indicam aumento significativo dos níveis de IL-10 no explante de animais I/R intestinal quando comparados com os obtidos em animais do grupo basal. Ainda, os animais do grupo sham, na presença do fluxo linfático intacto, também apresentaram aumento dos níveis de IL-10 em relação aos níveis basais, mas este aumento foi prevenido pela obstrução do fluxo linfático.

A quantidade de IL-10 encontrada no explante pulmonar de animais submetidos à isquemia intestinal e 120 h de reperfusão está representada no painel C. Como pode ser observado, neste período não houve alteração nos níveis desta citocina no explante pulmonar.

A análise dos efeitos da I/R intestinal ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados (painel D) revelou que no grupo I/R com ducto intacto não houve diferença significativa entre períodos de reperfusão. O bloqueio do ducto linfático nos animais submetidos a 120 h de reperfusão intestinal acarretou diminuição significativa dos níveis de IL-10 em comparação com animais submetidos à 24 h e 72 h de reperfusão intestinal.

Figura 12. Quantificação de IL-10 em sobrenadante de explante pulmonar. Após os períodos desejados de reperusão intestinal fragmentos de pulmão dos animais foram cultivados em meio de cultura por 24h e posteriormente o sobrenadante foi recolhido para determinação de citocinas. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais não manipulados (basal), sham (falso-operado) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os animais I/R intestinal foram submetidos a 45 min. de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) e 120 h (C) de reperusão. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; τP 24h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado; ωP 72h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado.

4.3 Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal na liberação pulmonar de mediadores inflamatórios

A figura 13 representa o perfil de geração dos mediadores inflamatórios avaliados neste estudo (IL-1 β , IL-6, VEGF, LTB₄, IL-10) em função do tempo de reperfusão intestinal em animais com o ducto linfático intacto (painel A) ou bloqueado (painel B).

Podemos observar que no explante pulmonar de animais com ducto linfático intacto os valores de IL-6, IL-10 e de LTB₄ se mantiveram inalterados ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados. Em relação ao VEGF notamos que após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal os níveis deste mediador no explante pulmonar foram semelhantes, porém após 120 h de reperfusão intestinal estes valores aumentaram. Já os níveis de IL-1 β aumentaram ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados.

No grupo de animais com ducto linfático bloqueado (Painel B) os níveis de IL-6 também não se alteraram durante os períodos de reperfusão intestinal estudados. Os valores de VEGF e de LTB₄ foram semelhantes após 24 h e 120 h de reperfusão intestinal, porém menores após 72 h de reperfusão em relação ao observado com 24 h. Em relação a IL-10 observamos que seus níveis se mantiveram similares após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal, diminuindo após 120 h. O mesmo aconteceu com os níveis de IL-1 β , porém aumentando após 120 h de reperfusão intestinal.

Figura 13. Resumo da quantificação de mediadores inflamatórios em explante pulmonar. Foram dosados os níveis de IL-1 β , IL-6, LTB₄, VEGF e IL-10 em meio de cultura de pulmões de animais submetidos à isquemia intestinal e a distintos períodos de reperusão (24h, 72h ou 120 h) com ducto linfático intacto (A) ou bloqueado (B).

4.4 *Análise hematológica*

4.4.1 Leucócitos totais

Após a isquemia intestinal e decorrido os períodos desejados de reperfusão, amostras de sangue dos animais foram coletadas e analisadas em leitor hematológico.

As figuras 14A (24 h de reperfusão intestinal) e 14B (72 h de reperfusão intestinal) indicam que a I/R intestinal não alterou o número de leucócitos no sangue dos animais. Porém, a falsa operação nos animais com ducto intacto promoveu aumento destas células em comparação como observado no sangue dos animais basais e em seu respectivo grupo I/R. Notamos ainda que o bloqueio do ducto linfático nestes grupos reduziu o número de leucócitos circulantes. No painel C observa-se que a I/R intestinal após 120 h não alterou o número de leucócitos circulantes. No painel D, onde estão representados os dados somente dos animais I/R intestinal, observamos que não houve diferença significativa no número de leucócitos totais no sangue dos animais submetidos aos diferentes períodos de reperfusão estudados.

Figura 14. Quantificação de leucócitos totais no sangue de animais submetidos à I/R intestinal. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão os animais foram anestesiados e o sangue retirado da artéria aorta abdominal. O sangue foi colocado em frascos com EDTA (5%) e analisado em leitor hematológico (ABC Vet). Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, falso-operado (sham) e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto.

4.4.2 Granulócitos

Na figura 15 estão representados os valores de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) quantificados no sangue de animais submetidos a I/R intestinal com ducto linfático intacto ou não. Como pode ser observado no painel A, animais submetidos à isquemia intestinal e 24 h de reperfusão com ducto linfático íntegro não demonstraram alteração no número de granulócitos circulantes em relação ao grupo basal, apresentando ainda redução desta célula em relação aos animais do grupo sham. Já os animais I/R com ducto linfático bloqueado apresentaram aumento do número de granulócitos circulantes em relação ao encontrado em animais basais.

Os dados do painel B indicam aumento significativo do número de granulócitos no sangue de animais do grupo sham com ducto linfático intacto e no sangue de animais do grupo I/R intestinal com ducto linfático bloqueado em relação aos animais do grupo basal. Além disso, o bloqueio do ducto linfático nos animais falso-operados atenuou significativamente o número de granulócitos circulantes em comparação com os animais do mesmo grupo que mantiveram o ducto linfático íntegro.

Após 120 h de reperfusão intestinal podemos observar aumento significativo do número de granulócitos no sangue de animais I/R intestinal com o fluxo linfático íntegro ou não em comparação com os animais do grupo basal (painel C). Observamos também que o aumento nos granulócitos circulantes no sangue dos animais I/R intestinal com ducto bloqueado foi significativamente maior que o encontrado em seu respectivo grupo sham.

Os dados do painel D representam os animais submetidos à isquemia intestinal sob diferentes períodos de reperfusão intestinal e revelam que não houve diferença significativa no número de granulócitos circulantes entre os diferentes períodos de reperfusão intestinal estudados.

Figura 15. Quantificação de granulócitos no sangue de animais submetidos à I/R intestinal. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperfusão os animais foram anestesiados e o sangue retirado da artéria aorta abdominal. O sangue foi colocado em frascos com EDTA (5%) e analisado em leitor hematológico (ABC Vet). Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado.

4.4.3 Linfócitos

A figura 16 representa o número de linfócitos no sangue de animais submetidos a I/R intestinal com ou sem ducto linfático intacto.

No painel A observamos que a I/R intestinal após 24 h de reperfusão reduziu o número de linfócitos no sangue dos animais em relação ao grupo basal. O mesmo aconteceu no grupo sham com ducto linfático bloqueado.

Os dados representados na figura 16B (72 h de reperfusão intestinal) revelam que não houve diferença significativa no número de linfócitos circulantes entre os grupos estudados. Com respeito a 120 h de reperfusão intestinal, observamos que o bloqueio do ducto linfático promoveu redução no número de linfócitos circulantes no sangue dos animais I/R intestinal em comparação com os animais do grupo basal.

O número de linfócitos obtidos em amostras de sangue dos animais isquêmicos e reperfundidos por diferentes períodos está representados no painel D e revelou que após 72 h de reperfusão intestinal, os animais com o ducto intacto apresentaram aumento no número de linfócitos circulantes em relação aos animais com o ducto nas mesmas condições, porém, reperfundidos por 24 h. Já o bloqueio do ducto linfático não alterou o número de linfócitos circulantes ao longo dos períodos estudados.

Figura 16. Quantificação de linfócitos no sangue de animais submetidos à I/R intestinal. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão os animais foram anestesiados e o sangue retirado da artéria aorta abdominal. O sangue foi colocado em frascos com EDTA (5%) e analisado em leitor hematológico (ABC Vet). Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal; ϕP 24h ducto intacto *versus* 72h ducto intacto.

4.4.4 Monócitos

O painel A da figura 17 representa o número de monócitos circulantes após a interrupção ou não do fluxo linfático em animais submetidos ou não à I/R intestinal. Observamos redução significativa no número de monócitos circulantes no grupo I/R intestinal 24 h com ducto linfático bloqueado em relação ao grupo basal. Nos demais períodos de estudo não foram observadas alterações no número de monócitos.

Quando comparamos somente os animais I/R intestinal (painel D), encontramos aumento no número de monócitos nos animais I/R 120 h de reperfusão com ducto linfático intacto em relação aos animais I/R 24 h com o ducto nas mesmas condições.

Figura 17. Quantificação de monócitos no sangue de animais submetidos à I/R intestinal. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão os animais foram anestesiados e o sangue retirado da artéria aorta abdominal. O sangue foi colocado em frascos com EDTA (5%) e analisado em leitor hematológico (ABC Vet). Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, falso-operado e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. $P < 0,05$. * P em relação ao grupo basal, ϕP 24h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto.

4.4.5 Plaquetas

Como pode ser observado no painel A da figura 18, a I/R intestinal após 24 h de reperfusão em animais com ducto linfático intacto e bloqueado reduziu o número de plaquetas circulantes quando comparado com os valores obtidos em animais dos grupos sham e basal.

No painel B notamos que após 72 h de reperfusão não houve diferença significativa no número de plaquetas entre os grupos estudados. Já a análise do painel C revelou que a I/R após 120 h de reperfusão, em animais com fluxo linfático normal, promoveu aumento do número de plaquetas em comparação com o número obtido nos grupos sham e basal. Além disso, o bloqueio do fluxo linfático nos animais I/R intestinal preveniu este aumento.

Finalmente, no painel D a análise temporal dos efeitos da I/R intestinal revelou que após 72 h e 120 h de reperfusão intestinal, os animais como ducto linfático intacto e bloqueado apresentaram aumento no número de plaquetas em relação aos animais reperfundidos por 24 h. Também podemos notar que o aumento no número de plaquetas após 120 h de reperfusão intestinal, nos animais com o fluxo linfático íntegro, foi significativamente maior que o observado nos animais submetidos a 72 h de reperfusão intestinal.

Figura 18. Quantificação de plaquetas no sangue de animais submetidos à I/R intestinal. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperfusão os animais foram anestesiados e o sangue retirado da artéria aorta abdominal. O sangue foi colocado em frascos com EDTA (5%) e analisado em leitor hematológico (ABC Vet). Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, falso-operado e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperfusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto versus I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado versus I/R ducto bloqueado; λP I/R ducto intacto versus I/R ducto bloqueado; ϕP 24h ducto intacto versus 72h e 120h ducto intacto; ϵP 72h ducto intacto versus 120h ducto intacto; τP 24h ducto bloqueado versus 120h ducto bloqueado; δP 120h ducto intacto versus 120h ducto bloqueado.

4.4.6 Hematócrito

A figura 19 representa o hematócrito de animais submetidos (ou não) à isquemia intestinal, com o ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperfusão.

No painel A podemos observar redução do hematócrito dos animais do grupo I/R intestinal (24 h de reperfusão intestinal) com ducto linfático intacto em relação ao observado em seu respectivo grupo sham e animais do grupo basal. Por outro lado, o bloqueio do fluxo linfático manteve o hematócrito aos níveis basais. O mesmo padrão de valores de hematócrito foi observado 72 h após a reperfusão intestinal. Já nos animais submetidos a 120 h de reperfusão intestinal (painel C) não encontramos diferença significativa nos valores de hematócrito entre os grupos estudados.

Ao analisarmos somente os animais isquêmicos e reperfundidos por diferentes períodos, com o fluxo linfático normal ou obstruído (painel D), observamos que após 120 h de reperfusão intestinal os animais como ducto linfático intacto apresentaram aumento do hematócrito em relação aos animais reperfundidos por 72 h. Por outro lado, o bloqueio do ducto linfático não alterou o hematócrito em nenhum todos os períodos de estudo.

Figura 19. Efeito da I/R intestinal sobre o hematócrito. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão os animais foram anestesiados e o sangue retirado da artéria aorta abdominal. O sangue foi colocado em frascos com EDTA (5%) e analisado em leitor hematológico (ABC Vet). Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕ *P* sham ducto intacto *versus* I/R ducto intacto; ϵ *P* 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto.

4.5 Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal sobre o número de leucócitos sanguíneos

A figura 20 representa o número de leucócitos no sangue de animais com ducto linfático intacto (painel A) ou bloqueado (painel B) ao longo dos tempos de reperfusão intestinal avaliados neste estudo.

Podemos observar no grupo de animais I/R intestinal com ducto linfático intacto que o número de plaquetas aumentou ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados, já o número de leucócitos totais e de granulócitos não se alterou durante os períodos avaliados. Em relação aos linfócitos, observamos aumento em sua quantidade no sangue dos animais após 72 h de reperfusão intestinal em relação ao encontrado após 24 h, diminuindo com 120 h de reperfusão. Observamos também que o número de monócitos circulantes após 72 h e 120 h de reperfusão intestinal aumentou em relação ao encontrado com 24 h de reperfusão intestinal.

No grupo de animais I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado observamos que após 24 h de reperfusão intestinal o número de plaquetas foi menor que o observado com 72 h e 120 h de reperfusão, e que nestes últimos períodos os valores de plaquetas foram similares. Em relação às outras células estudadas (leucócitos totais, granulócitos, linfócitos e monócitos) não observamos alterações em seus números ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados.

Figura 20. Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal no número de células sanguíneas. Foram determinados os valores de leucócitos totais, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas no sangue de animais submetidos à isquemia intestinal e a distintos períodos de reperfusão (24h, 72h ou 120 h) com ducto linfático intacto (A) ou bloqueado (B).

4.6 *Análise imuno-histoquímica de pulmão*

4.6.1 Efeito da I/R intestinal na expressão de vWf nos vasos pulmonares

A expressão de vWf no endotélio pulmonar de animais submetidos (ou não) à I/R intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado está representada nas figuras 21 e 22.

Podemos observar que após 24 h e 72 h de reperfusão (painéis A e B), a I/R intestinal não alterou o expressão de vWf nos vasos pulmonares em comparação com sua expressão basal. Observamos ainda que após 24 h de reperfusão a expressão de vWf no grupo I/R com ducto linfático bloqueado foi significativamente maior que a observada em seu respectivo grupo sham e no grupo I/R com ducto linfático intacto. Porém, após 72 h de reperfusão intestinal, a expressão desta molécula no grupo I/R intestinal com ducto bloqueado foi maior em relação a observada no grupo com ducto linfático intacto.

Após 120 h de reperfusão intestinal (painel C) observamos redução da expressão de vWf nos animais dos grupos sham e I/R intestinal com ducto intacto e bloqueado em relação aos valores do grupo basal. Notamos ainda que o bloqueio do ducto linfático no grupo I/R aumentou significativamente a expressão de vWf em comparação com o grupo com ducto linfático intacto.

A análise geral dos efeitos da I/R intestinal em distintos períodos de reperfusão revelou diminuição da expressão de vWf no endotélio pulmonar dos animais com ducto linfático intacto após 120 h de reperfusão intestinal em relação aos valores encontrados após 24 h e 72 h. Já no grupo com o ducto linfático bloqueado observamos redução significativa na expressão desta molécula ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados.

Figura 21. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de vWf no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti-vWf e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; μ *P* sham ducto bloqueado versus I/R ducto bloqueado; λ *P* I/R ducto intacto versus I/R ducto bloqueado; ϕ *P* 24h ducto intacto versus 120h ducto intacto, ϵ *P* 72h ducto intacto versus 120h ducto intacto; τ *P* 24h ducto bloqueado versus 72h e 120h ducto bloqueado; ω *P* 72h ducto bloqueado versus 120h ducto bloqueado.

Figura 22. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-vWf. (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x.

4.6.2 Efeito da I/R intestinal na expressão de integrina β_1 nos vasos pulmonares

A expressão de integrina β_1 no endotélio pulmonar de animais submetidos a I/R intestinal com ducto linfático íntegro ou bloqueado está representada nas figuras 23 e 24. Podemos observar que a I/R intestinal, após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal (painéis A e B), não alterou a expressão de integrina β_1 . Porém, após 120 h de reperfusão intestinal observamos aumento significativo na expressão desta integrina no endotélio pulmonar dos animais do grupo I/R com ducto intacto em relação ao observado no grupo basal e em seu respectivo grupo sham. Além disso, a expressão de β_1 nos vasos dos animais I/R com ducto bloqueado também foi significativamente maior que a encontrada em seu respectivo grupo sham.

A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal (painel D) revelou que a expressão de integrina β_1 no endotélio pulmonar dos animais submetidos a 120 h de reperfusão intestinal com ducto linfático intacto foi maior que a observada após 24 h.

Figura 23. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de integrina β_1 no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti- β_1 e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕ *P* sham ducto intacto *versus* I/R ducto intacto, μ *P* sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado, ϕ *P* 24h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto.

Figura 24. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-Integrina β_1 . (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x

4.6.3 Efeito da I/R intestinal na expressão de PECAM-1 nos vasos pulmonares

A expressão de PECAM-1 no endotélio pulmonar de animais submetidos a I/R intestinal com ducto linfático íntegro ou bloqueado está representada nas figuras 25 e 26.

No painel A podemos observar que após 24 h a I/R intestinal, no grupo de animais com o ducto linfático intacto, reduziu significativamente a expressão de PECAM-1 endotelial em relação aos valores basais e aos valores encontrados em seu respectivo grupo sham. Além disso, o bloqueio do ducto linfático neste grupo foi capaz de prevenir esta redução.

Após 72 h de reperfusão intestinal (painel B) a expressão de PECAM-1 nos vasos pulmonares dos animais do grupo I/R e sham com ducto linfático intacto foi significativamente menor que a observada no grupo basal. Já no grupo com ducto linfático bloqueado não observamos alteração na expressão endotelial de PECAM-1.

Os dados apresentados no painel C indicam que após 120 h de reperfusão intestinal, o bloqueio do ducto linfático foi capaz de reduzir significativamente a expressão de PECAM-1 no endotélio pulmonar dos animais dos grupos I/R em relação aos valores basais e também em comparação ao seu respectivo grupo com ducto linfático intacto. No grupo sham com ducto bloqueado também observamos redução de PECAM endotelial em comparação ao basal.

A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal (painel D) revelou aumento da expressão de PECAM-1 nos animais com ducto linfático intacto após 120 h de reperfusão intestinal em relação aos valores encontrados após 24 h e 72 h. Observamos ainda que no grupo com ducto linfático bloqueado, a expressão desta molécula após 120 h foi significativamente menor que a encontrada após 24 h de reperfusão intestinal.

Figura 25. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de PECAM-1 no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti-PECAM-1 e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕ *P* sham ducto intacto *versus* I/R ducto intacto; λ *P* I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado; ϕ *P* 24h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; ε *P* 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; τ *P* 24h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado.

Figura 26. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-PECAM-1. (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x

4.6.4 Efeito da I/R intestinal na expressão de VE-caderina nos vasos pulmonares

A expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar de animais submetidos (ou não) à I/R intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado está representada nas figuras 27 e 28.

Após 24 h de reperfusão intestinal (painel A) observamos aumento significativo na expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar dos animais dos grupos I/R em relação aos valores basais e em relação ao seu respectivo grupo sham. Observamos ainda que o bloqueio do ducto linfático reduziu a expressão de VE-caderina no grupo I/R. O aumento na expressão de VE-caderina em relação ao basal também foi observado no grupo sham.

No painel B observamos que os grupos I/R intestinal e sham apresentaram aumento na expressão de VE-caderina nos vasos pulmonares após 72 h em relação à expressão basal desta molécula. Notamos também que o aumento na expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar do grupo I/R intestinal com e sem ducto intacto foi menor que a observada em seu respectivo grupo sham.

Após 120 h de reperfusão (painel C) observamos que a I/R intestinal causou aumento da expressão de VE-caderina nos vasos pulmonares destes animais em relação aos valores basais. O mesmo fenômeno pode ser observado em relação aos animais do grupo sham com ducto linfático intacto.

A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal revelou diminuição da expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar dos animais reperfundidos por 72 h com ducto intacto em relação aos animais reperfundidos por 24 h e após 120 h estes valores voltaram a aumentar. O bloqueio do ducto linfático não alterou a VE-caderina endotelial ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados.

Figura 27. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti- VE-caderina e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕP sham ducto intacto *versus* I/R ducto intacto, μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; λP I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado; ϕP 24h ducto intacto *versus* 72h ducto intacto; ϵP 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto.

Figura 28. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-VE-caderina. (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x

4.6.5 Efeito da I/R intestinal na expressão de fibronectina nos vasos pulmonares

A análise da expressão de fibronectina no endotélio pulmonar de ratos após a I/R intestinal está representada nas figuras 29 e 30. Podemos observar que após 24 h de reperfusão (painel A) no grupo com ducto linfático intacto houve aumento significativo da expressão de fibronectina nos vasos pulmonares em relação a sua expressão basal. Notamos ainda que este aumento também foi significativo no grupo sham com ducto intacto e que o bloqueio do ducto linfático neste grupo foi capaz de prevenir este aumento. Já no grupo I/R, o bloqueio do ducto não alterou a expressão desta molécula.

Após 72 h de reperfusão intestinal (painel B) observamos aumento na expressão de fibronectina no endotélio pulmonar dos animais do grupo I/R com ducto intacto em relação aos valores do grupo basal. O mesmo aconteceu no grupo sham após 72 h da manipulação.

No painel C observamos que após 120 h, a I/R intestinal aumentou a expressão de fibronectina no endotélio quando comparada com a expressão basal. No grupo sham com ducto linfático intacto também observamos aumento da expressão desta molécula em relação aos valores do grupo basal, porém neste grupo, o bloqueio do ducto linfático foi capaz de prevenir este aumento.

A avaliação temporal da expressão de fibronectina (painel D) em distintos períodos de reperfusão intestinal revelou que o aumento na sua expressão se manteve ao longo dos períodos estudados.

Figura 29. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de fibronectina no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti-fibronectina e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕ *P* sham ducto intacto versus sham ducto bloqueado.

Figura 30. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-fibronectina. (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x

4.6.6 Efeito da I/R intestinal na expressão de colágeno I nos vasos pulmonares

A análise da expressão de colágeno tipo I no endotélio pulmonar de ratos submetidos a I/R intestinal está representada nas figuras 31 e 32. Podemos observar que após 24 h de reperfusão intestinal (painel A), a I/R e a falsa operação causaram aumento significativo na expressão de colágeno I nos vasos pulmonares dos animais destes grupos em relação à expressão basal desta molécula. O mesmo foi observado após 72 h de reperfusão intestinal (painel B), excetuando-se o grupo sham com o ducto linfático bloqueado, que não apresentou alteração na expressão desta molécula em relação aos valores do grupo basal.

No painel C, podemos notar que 120 h após o início da reperfusão intestinal houve aumento significativo na expressão de colágeno I nos vasos pulmonares dos animais do grupo I/R em comparação com os valores do grupo basal. Observamos também neste grupo aumento da expressão desta molécula em relação aos seus respectivos grupos sham. Ainda neste período, notamos que o grupo sham apresentou aumento de colágeno I no endotélio pulmonar em comparação com o grupo basal e que o bloqueio do ducto linfático neste grupo reduziu a expressão de colágeno endotelial quando comparado com o grupo com o ducto intacto.

Analisando os efeitos temporais da I/R intestinal (painel D), notamos que os animais reperfundidos por 120 h com ducto intacto ou não apresentaram aumento significativo na expressão de colágeno I em seu endotélio pulmonar quando comparado com a expressão observada nos períodos de reperfusão intestinal anteriores.

Figura 31. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de colágeno tipo I no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti-colágeno 1 e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕ *P* sham ducto intacto versus sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μ *P* sham ducto bloqueado versus I/R ducto bloqueado; ϕ *P* 24h ducto intacto versus 120h ducto intacto, ε *P* 72h ducto intacto versus 120h ducto intacto; τ *P* 24h ducto bloqueado versus 120h ducto bloqueado; ω *P* 72h ducto bloqueado versus 120h ducto bloqueado.

Figura 32. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-colágeno tipo I. (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x.

4.6.7 Efeito da I/R intestinal na expressão de colágeno IV nos vasos pulmonares

A análise da expressão de colágeno tipo IV no endotélio pulmonar de ratos submetidos ou não à I/R intestinal está representada nas figuras 33 e 34.

No painel A, observamos aumento da expressão desta molécula nos vasos pulmonares dos animais dos grupos sham e I/R após 24 h de reperfusão em comparação com a expressão observada no grupo basal. Podemos notar também que os animais do grupo I/R que tiveram o ducto linfático bloqueado apresentaram menor expressão de colágeno IV em comparação com os animais com o ducto linfático intacto.

No painel B, notamos que 72 h de reperfusão intestinal nos animais com o ducto linfático íntegro, aumentou a expressão endotelial de colágeno IV. Em contrapartida, o bloqueio do ducto neste grupo foi capaz de prevenir este aumento.

No período de 120 h (painel C) observamos que tanto a I/R intestinal quanto a falsa operação foram capazes de aumentar significativamente a expressão de colágeno tipo V no endotélio pulmonar em comparação com os valores observados no grupo basal. Notamos também que o aumento na expressão desta molécula no grupo I/R foi significativamente maior que o observado em seu respectivo grupo sham. Ainda, o bloqueio do ducto linfático tanto no grupo sham quanto no grupo I/R foi capaz de reduzir este aumento na expressão de colágeno observada nos grupos com o ducto linfático intacto.

A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal (painel D) revelou, tanto nos animais com ducto intacto quanto com ducto bloqueado, redução na expressão de colágeno endotelial no pulmão dos animais reperfundidos por 72 h em relação ao observado após 24 h de reperfusão intestinal. Com 120 h de reperfusão intestinal, observamos aumento significativo na expressão de colágeno IV em relação ao observado nos períodos anteriores de reperfusão intestinal.

Figura 33. Efeito da I/R intestinal sobre a expressão de colágeno tipo IV no endotélio pulmonar. Após 45 min de isquemia intestinal seguido de 24 h (A), 72 h (B) ou 120 h (C) de reperusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão preenchido com OCT. Cortes histológicos foram incubados com anticorpo anti-colágeno 4 e analisados pelo software Image-J. Os grupos representados nos painéis A, B e C consistiram de animais basais, sham e I/R intestinal com o ducto linfático bloqueado ou não. Os grupos representados no painel D consistiram somente de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperusão. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; ϕ *P* sham ducto intacto *versus* sham ducto bloqueado e I/R ducto intacto; μ *P* sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; λ *P* I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado; ϕ *P* 24h ducto intacto *versus* 72h e 120h ducto intacto, ε *P* 72h ducto intacto *versus* 120h ducto intacto; τ *P* 24h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado; ω *P* 72h ducto bloqueado *versus* 120h ducto bloqueado.

Figura 34. Imunohistoquímica em vasos pulmonares com anticorpo anti-colágeno tipo IV. (A) sham ducto intacto, (B) sham ducto bloqueado, (C) I/R ducto intacto e (D) I/R ducto bloqueado. Aumento de 40x.

4.7 Resumo dos efeitos temporais da I/R intestinal na expressão de moléculas endoteliais

A figura 35 representa um resumo das alterações na expressão das moléculas endoteliais avaliadas neste estudo após distintos períodos de reperfusão intestinal em animais com o ducto linfático intacto (painel A) ou bloqueado (painel B).

No grupo de animais submetidos à I/R intestinal com o ducto linfático intacto (painel A) observamos que a expressão de vWf foi similar após 24 h e 72 h de reperfusão, porém com 120 h ela diminuiu. A expressão de integrina β_1 , PECAM-1 e colágeno I após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal se assemelham, todavia, após 120 h de reperfusão intestinal a expressão destas moléculas aumenta. Em relação à fibronectina observamos que sua expressão se mantém inalterada ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados. A análise da expressão da VE-caderina e do colágeno IV revelou diminuição após 72 h de reperfusão intestinal em relação a 24 h, e aumento após 120 h de reperfusão intestinal.

Em relação aos animais com ducto linfático bloqueado (painel B) observamos que a expressão de vWf e PECAM-1 diminuiu ao longo dos tempos de reperfusão intestinal estudados. Enquanto a expressão de integrina β_1 , VE-caderina e fibronectina não se alterou durante os períodos estudados. Já a expressão de colágeno I e IV aumentou em relação aos períodos anteriores após 120 h de reperfusão intestinal.

Figura 35. Resumo ds efeitos temporais da I/R intestinal na expressão de moléculas endoteliais. Foram avaliadas a expressão de integrina b1, PECAM-1, VE-caderina, fibronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV e vWf no endotélio pulmonar de animais submetidos à isquemia intestinal e a distintos períodos de reperusão (24h, 72h ou 120 h) com ducto linfático intacto (A) ou obstruído (B).

4.8 Repercussão pulmonar e intestinal do tratamento com antibiótico.

4.8.1 Atividade de MPO pulmonar

Levando-se em consideração que após 120 h de reperfusão intestinal observamos aumento na atividade de MPO pulmonar nos animais com o ducto linfático intacto em relação ao observado nos animais do grupo basal e nos animais reperfundidos por 72 h (Vide figura 3), grupos de animais foram tratados com Pentabiótico® 1 h antes da indução da I/R intestinal, imediatamente após o término da isquemia intestinal e após 1 h e 96 h do início da reperfusão intestinal. Decorrido 120 h de reperfusão intestinal, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão foi quantificada. Estes resultados estão representados na figura 40.

Como pode ser observado nos animais com o ducto linfático intacto, o tratamento com pentabiótico em todos os períodos estudados reduziu significativamente a MPO pulmonar em comparação com a MPO dos animais não tratados. Notamos também que, com exceção dos animais tratados após 1 h do início da reperfusão intestinal, o pentabiótico permitiu o retorno da MPO pulmonar a níveis basais. O tratamento realizado após 1 h de reperfusão intestinal, mesmo reduzindo a MPO pulmonar em relação ao grupo não tratado, permitiu maior infiltrado de neutrófilos no pulmão que o observado no grupo basal e nos outros períodos de tratamento.

Em relação aos grupos com o ducto linfático bloqueado, observamos que os tratamentos realizados antes e após a isquemia e 96 h após o início da reperfusão intestinal preveniram o aumento da MPO pulmonar observada no grupo não tratado. Notamos ainda que o tratamento realizado após 1 h de reperfusão intestinal não alterou a MPO pulmonar, uma vez que esta não diferiu da encontrada no grupo sem tratamento.

Figura 36. Efeito do tratamento com pentabiótico na atividade de MPO pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal. Os animais foram tratados (ou não) com pentabiótico (i.m.) em diferentes períodos do processo de I/R intestinal. Após 120 h de reperfusão, os animais foram eutanasiados e o pulmão homogeneizado para determinação da atividade da enzima mieloperoxidase. Os grupos representados no painel A consiste de animais submetidos a isquemia intestinal com ducto linfático intacto ou bloqueado e a diferentes períodos de reperfusão. Os grupos representados no painel B consiste de animais tratados ou não com pentabiótico e submetidos a 120 h de reperfusão intestinal. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; α *P* sem tratamento ducto intacto *versus* tratados; β *P* tratado 1 h antes da isquemia ducto intacto *versus* outros tratamentos; χ *P* tratado após isquemia ducto intacto *versus* outros tratamentos; γ *P* tratado após 1 h de reperfusão ducto intacto *versus* outros tratamentos; μ *P* sem tratamento ducto bloqueado *versus* tratados; π *P* tratado 1 h antes da isquemia ducto bloqueado *versus* outros tratamentos; η *P* tratado após isquemia ducto bloqueado *versus* outros tratamentos; ν *P* tratado após 1 h de reperfusão ducto bloqueado *versus* outros tratamentos.

4.8.2 Extravasamento do corante Azul de Evans no pulmão e intestino

A permeabilidade vascular pulmonar e intestinal de animais tratados com pentabiótico e submetidos à isquemia intestinal e a 120 h de reperfusão está representada na figura 41. Observando o painel A notamos que, nos grupos com o ducto linfático intacto, o tratamento com pentabiótico nos diferentes momentos do processo de indução da I/R intestinal reduziu significativamente a permeabilidade microvascular pulmonar em comparação com a permeabilidade observada no grupo não tratado. Observamos também que os tratamentos realizados 1 h antes da I/R intestinal e logo após o término da isquemia permitiram o retorno da permeabilidade pulmonar a níveis basais. E ainda, os tratamentos realizados após 1 h e 96 h do início da reperfusão intestinal, mesmo reduzindo a permeabilidade pulmonar em relação ao grupo não tratado, permitiram maior extravasamento protéico no pulmão que o observado no grupo basal e nos outros tratamentos.

Em relação aos animais com o ducto linfático bloqueado, observamos que a permeabilidade microvascular pulmonar reduziu significativamente nos grupos tratados antes e imediatamente após a isquemia e 96 h após o início da reperfusão intestinal, retornando aos valores basais. Notamos ainda que o tratamento realizado após 1 h o início da reperfusão intestinal não alterou a permeabilidade pulmonar, uma vez que esta não diferiu da encontrada no grupo sem tratamento. Vale ressaltar também que o tratamento com pentabiótico 96 h após a reperfusão intestinal, mesmo reduzindo a permeabilidade pulmonar em relação ao grupo sem tratamento, foi capaz de promover maior extravasamento do corante AE no pulmão destes animais que o observado no grupo tratado antes da I/R intestinal. Ainda em relação a este grupo, observamos que o bloqueio do ducto linfático reduziu significativamente a permeabilidade pulmonar em comparação ao grupo como ducto intacto, o mesmo aconteceu, como já demonstrado anteriormente (Vide figura 5), com o grupo sem tratamento.

Em relação a permeabilidade microvascular intestinal (painel B), observamos que o tratamento com pentabiótico realizado antes e após a isquemia e após 96 h de reperfusão intestinal, tanto nos animais com o ducto linfático intacto quanto nos animais com ducto bloqueado, foi capaz de prevenir o aumento da permeabilidade intestinal observada nos animais não tratados. Ressaltamos também que o tratamento realizado após 1 h de reperfusão intestinal não alterou a permeabilidade intestinal, uma vez que esta não diferiu da encontrada no grupo sem tratamento.

Figura 37. Efeito do tratamento com pentabiótico na permeabilidade microvascular pulmonar e intestinal após 120 h de reperfusão intestinal. Os animais foram tratados (ou não) com pentabiótico (i.m.) em diferentes períodos do processo de I/R intestinal. Após 120 h de reperfusão determinamos a permeabilidade microvascular pulmonar (painel A) e intestinal (painel B). Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M. **P* em relação ao grupo basal; α *P* sem tratamento ducto intacto *versus* tratados; β *P* tratado 1 h antes da isquemia ducto intacto *versus* outros tratamentos; χ *P* tratado após isquemia ducto intacto *versus* outros tratamentos; γ *P* tratado após 1 h de reperfusão ducto intacto *versus* outros tratamentos; κ *P* tratado após 96 h de reperfusão ducto intacto *versus* tratado após 96 h de reperfusão ducto bloqueado; μ *P* sem tratamento ducto bloqueado *versus* tratados; π *P* tratado 1 h antes da isquemia ducto bloqueado *versus* outros tratamentos; η *P* tratado após isquemia ducto bloqueado *versus* outros tratamentos; ν *P* tratado após 1 h de reperfusão ducto bloqueado *versus* outros tratamentos.

4.9 Taxa de sobrevivência

A figura 42 representa a taxa de sobrevivência dos animais sham e I/R intestinal com o ducto torácico linfático intacto ou bloqueado. Como pode ser observado, em contraste aos animais do grupo sham, que apresentaram baixo índice de mortalidade, a isquemia e reperfusão intestinal gera alta taxa de mortalidade nas primeiras 24 h. Podemos notar ainda que o bloqueio do fluxo linfático antes da isquemia causou maior mortalidade em comparação ao observado nos animais isquêmicos e reperfundidos com o ducto linfático íntegro.

Figura 38. Efeito da I/R intestinal na sobrevivência dos animais. Os grupos representados consistiram de animais sham e I/R intestinal com o ducto linfático intacto ou bloqueado. O bloqueio do ducto torácico linfático foi realizado previamente à indução da isquemia. Os dados representam a porcentagem de mortalidade nas primeiras 24 h de reperfusão intestinal. $P < 0,05$. ϕP sham ducto intacto *versus* I/R ducto intacto; μP sham ducto bloqueado *versus* I/R ducto bloqueado; λP I/R ducto intacto *versus* I/R ducto bloqueado.

5 Discussão

Os dados apresentados neste estudo referem-se à inflamação pulmonar causada por evento isquêmico intestinal seguido de distintos períodos de reperfusão. Para tanto, utilizando como modelo experimental ratos Wistar, induzimos a oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos e analisamos parâmetros inflamatórios sistêmicos, no pulmão e no intestino, 24, 72 ou 120 horas após a reperfusão intestinal. A introdução de períodos prolongados de reperfusão intestinal decorre de estudos anteriores do nosso laboratório avaliando períodos mais curtos (30 min, 2 h e 4 h) de reperfusão intestinal. Neste sentido, consideramos que a reperfusão prolongada poderia expor o organismo a condições de estresse adicionais.

Uma das conseqüências da I/R intestinal é a lesão pulmonar aguda que em condições mais graves pode evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A SDRA, embora possa ter início agudamente, pode persistir por dias e até semanas (HUDSON et al, 1995; BHATIA e MOOCHHALA, 2004; LUH et al., 2007). O pulmão acometido por inflamação apresenta infiltrado neutrofílico, aumento da permeabilidade vascular, danos à barreira do epitélio alveolar e comprometimento das trocas gasosas. Por causa disso, dois aspectos acerca da SDRA tornam seu estudo relevante: a falta de terapia medicamentosa eficaz e a alta taxa de mortalidade (LUH et al., 2007; LEWANDOWSKI e LEWANDOWSKI, 2006). Além disso, baseados em estudos do nosso laboratório (CAVRIANI et al., 2005; CAVRIANI et al., 2007; COELHO et al., 2007; BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009) e naqueles descritos para eventos traumáticos associados ao choque hemorrágico (DEITCH et al., 2001; DAVIDSON et al., 2004), lançamos a hipótese de que o intestino, sob sofrimento isquêmico, pode ser considerado um potente gerador de mediadores inflamatórios, os quais, uma vez drenados pelo sistema linfático, atingem a circulação pulmonar, comprometem a sua homeostasia, causam recrutamento de neutrófilos, edema, contribuindo para a lesão tecidual e para a disfunção pulmonar frequentemente observada na SDRA. Nesse sentido, a questão sobre os efeitos prolongados da reperfusão intestinal associados a distúrbios inflamatórios permanece aberta.

Inicialmente avaliamos as repercussões pulmonares e intestinais da I/R intestinal em estudos que ficaram circunscritos à quantificação indireta de neutrófilos no pulmão e no intestino por meio da atividade da enzima mieloperoxidase. Também avaliamos a permeabilidade vascular pulmonar e intestinal por meio da quantificação do corante azul de

Evans extravasado. Duas condições foram investigadas, animais com o ducto linfático torácico intacto ou obstruído. A I/R intestinal promoveu aumento significativo da MPO pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal, sendo que nos demais períodos de reperfusão estudados (24 e 72 h) não houve alteração. No intestino, local de obstrução da artéria, a I/R intestinal não alterou a MPO em nenhum dos tempos de reperfusão intestinal estudados. Além disso, a ligação do ducto torácico linfático também não alterou a atividade de MPO no pulmão e no intestino. A respeito destes dados, é interessante notar que nossos estudos utilizando 2 h de reperfusão intestinal revelaram aumento da atividade de MPO e do extravasamento protéico e que esses eventos são dependentes da integridade do fluxo linfático (CAVRIANI et al., 2005). Portanto, considerando os períodos de reperfusão intestinal, sugere-se que neutrófilos ativados e recrutados para o pulmão após 2 h de reperfusão intestinal, possam ao longo do tempo (24 e 72 h de reperfusão intestinal), serem removidos por apoptose/fagocitose, contribuindo assim, para a homeostasia pulmonar. Por outro lado, o aumento de MPO pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal pode sugerir que o intestino, após a lesão isquêmica e a reperfusão, mantenha um estado pró-reativo capaz de liberar mediadores que reestimulam o pulmão. Estabelecendo assim, a hipótese de ondas inflamatórias. Nesta condição, alterações da homeostasia podem ocorrer ao longo de horas após a correção da perfusão, justificando a inflamação pulmonar em períodos tardios. É importante ressaltar ainda que a redução da atividade de MPO pulmonar observada em animais com o fluxo linfático obstruído em relação aos animais com o ducto linfático intacto após 2 h de reperfusão intestinal descrita por Cavriani et al. (2005) não ocorreu nos períodos de reperfusão intestinal estudados neste trabalho. Este fato pode estar relacionado com o importante papel do sistema linfático na fase inicial da inflamação, transportando para o pulmão os mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos originados no intestino, causando inflamação pulmonar aguda. Apesar disso, no intestino não houve recrutamento de neutrófilos após a I/R intestinal. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Souza et al. (2003) mostrando que o intestino não é capaz de acumular neutrófilos, possivelmente devido a diferenças na capacidade das células residentes deste órgão em interagir com os neutrófilos migratórios e promover sua adesão.

Como a I/R intestinal estimula a liberação de uma gama de mediadores inflamatórios que podem gerar aumento da permeabilidade microvascular (ISHII et al., 2000), investigamos se haviam alterações na permeabilidade vascular pulmonar e intestinal. O aumento da permeabilidade vascular no pulmão e no intestino foi identificado após 120 h de reperfusão intestinal. É interessante notar que neste período de reperfusão a obstrução do fluxo linfático

reduziu o aumento da permeabilidade vascular pulmonar. Esses dados comparados com aqueles obtidos com 2 h de reperfusão intestinal (CAVRIANI et al., 2005) revelam um perfil temporal de modulação da inflamação e consequentemente da permeabilidade vascular pois, após 2 h de reperfusão intestinal ocorre aumento da permeabilidade pulmonar; com períodos de reperfusão intestinal mais prolongados (24 h e 72 h) estes valores retornam aos valores basais. Todavia, com 120 h de reperfusão intestinal a permeabilidade vascular pulmonar volta a aumentar. Vale lembrar que no pulmão, o extravasamento protéico se inicia precocemente com 30 min de reperfusão e assim se mantém por 2 h e 4 h (CAVRIANI et al., 2004). No conjunto, estes dados podem sugerir que mediadores inflamatórios drenados pelo sistema linfático no intestino 120 h após o início da reperfusão intestinal podem estar relacionados com as repercussões pulmonares nesse período. Além disso, a redução do aumento da permeabilidade vascular pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal nos animais com o fluxo linfático obstruído sugere a existência de mecanismos distintos no controle da permeabilidade vascular e do recrutamento de neutrófilos. Como mencionado por Cavriani et al, 2004, o extravasamento plasmático é mais sensível a mediadores carregados pela linfa do que o recrutamento de neutrófilos. No geral, nossos dados apontam para alterações no pulmão causadas pela I/R intestinal em períodos precoces de reperfusão. Estas alterações são sucedidas por um período de normalidade (silêncio inflamatório), porém subsequentemente, novas alterações na permeabilidade vascular e no recrutamento celular são desencadeadas.

A respeito dos mecanismos envolvidos com o recrutamento de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular, os mediadores inflamatórios ocupam lugar de destaque na modulação destes fenômenos. Com base nisso, avaliamos a presença de alguns mediadores sabidamente envolvidos nestes eventos, na linfa e no meio de cultura de explantes pulmonares tomando como base a hipótese de que o intestino é gerador de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , LTB₄ e TXB₂ (NARITA et al., 2004; ROSSI et al., 2007), que uma vez carregados até os pulmões pelo sistema linfático, interferem na homeostasia deste órgão (KOIKE et al., 2000; BORJESSON et al., 2000). O pulmão, uma vez estimulado pelas citocinas inflamatórias, ativa células residentes que liberam substâncias quimiotáticas, outros mediadores ou ainda amplificam a secreção dessas citocinas. Dados do nosso laboratório suportam esta visão visto que, após isquemia intestinal e 2 horas de reperfusão, a linfa é rica em TNF- α (CAVRIANI et al., 2005), IL-1 β , IL-10 (CAVRIANI et al., 2007) e IL-6 (BREITHAUP-T-FALOPPA et al., 2009) e que estas citocinas se associam a indução da inflamação pulmonar causada pela I/R intestinal. Entretanto, a presença de mediadores inflamatórios na linfa de animais submetidos a I/R intestinal varia durante a reperfusão, o que

reveste de importância adicional o estudo temporal da presença desses mediadores na linfa dos animais submetidos a diferentes períodos de reperfusão intestinal. Realmente, nossos estudos mostraram que altos níveis de IL-1 β , IL-6 e VEGF foram encontrados na linfa dos animais isquêmicos nos períodos de reperfusão intestinal estudados em comparação com os níveis basais destes mediadores. Porém, uma maior quantidade de IL-1 β , VEGF e LTB₄ foi detectada na linfa 24 h após o início da reperfusão em relação aos outros períodos, mostrando uma oscilação no nível destas citocinas ao longo do tempo de reperfusão intestinal. Em contrapartida, o aumento nos níveis de IL-6 na linfa não se modificou nos diferentes períodos de reperfusão intestinal estudados. Vale notar que a IL-10 não foi detectada na linfa dos animais I/R intestinal. Estes fatos estão de acordo com a nossa hipótese de que mediadores inflamatórios são temporalmente transportados pelo sistema linfático, porém, como observamos maior inflamação pulmonar, com aumento da atividade de MPO e da permeabilidade vascular pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal, podemos supor que outras vias, como o sistema circulatório, transportem ou gerem mediadores inflamatórios responsáveis por esta inflamação. De fato, estudos anteriores revelam que a obstrução do fluxo linfático não preserva totalmente as repercussões pulmonares e sistêmicas da I/R intestinal (CAVRIANI et al., 2005; CAVRIANI et al., 2007). Além disso, notamos também que a obstrução do fluxo linfático torácico não reduziu significativamente a MPO pulmonar, sugerindo que o sistema linfático, apesar de conter quantidades significativas de mediadores inflamatórios mesmo após diversos dias do início da reperfusão intestinal, diferentemente do observado após 2 h de reperfusão (CAVRIANI et al., 2005), não medeia a inflamação pulmonar após longos períodos de reperfusão intestinal. Ainda, estes dados podem inferir que os mediadores inflamatórios carregados pela linfa ao longo dos dias de reperfusão intestinal estimulem constantemente o pulmão que até certo ponto consegue manter sua homeostasia, porém, após 120 h, alterações no microambiente pulmonar poderiam levar à quebra do silêncio inflamatório.

Partindo da idéia que o pulmão pode ser estimulado por mediadores gerados no intestino e transportados pelos sistemas linfático e circulatório que então ativam células residentes, leucócitos aderidos e células constitutivas que passam a liberar mediadores inflamatórios, foram quantificadas algumas citocinas presentes no meio de cultura de explantes de pulmão para avaliar o estado inflamatório deste órgão. Nossos resultados mostraram que I/R intestinal promoveu aumento nos níveis de IL-1 β no explante pulmonar dos animais em todos os períodos de reperfusão intestinal estudados em relação aos níveis

detectados no explante dos animais basais. Nos animais com ducto linfático intacto, observamos aumento dos níveis desta citocina ao longo dos períodos de reperfusão intestinal, sendo significativamente maiores após 120 h de reperfusão intestinal do que nos períodos anteriores. No caso dos animais com ducto bloqueado os níveis de IL-1 β foram maiores após 120 h de reperfusão intestinal em comparação com o observado após 24 h. Em conjunto, estes resultados sugerem que os níveis de IL-1 β aumentam após a I/R intestinal e que esta citocina pode participar da inflamação pulmonar ativando neutrófilos e regulando a geração de moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais. Apesar disso, estes dados devem ser visto com cautela uma vez que a manipulação do intestino no grupo falso-operado também elevou os níveis de IL-1 β .

Com relação à quantificação de IL-6 observamos que tanto a I/R intestinal quanto a falsa operação (grupo sham), nos diferentes períodos de reperfusão estudados, induziram aumento dos níveis desta citocina no explante pulmonar e que a obstrução do fluxo linfático não interferiu neste aumento. Além disso, a quantificação de IL-6 nos períodos de reperfusão intestinal estudados não diferiu, mostrando assim, uma correlação com o observado na linfa. A IL-6 participa de processos imunológicos, hematopoiéticos e da inflamação, neste último caso modulando proliferação celular, diferenciação de leucócitos e apoptose (FAN et al., 2007). É produzida por monócitos/macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas em resposta a estimulação por endotoxinas, IL-1 β e TNF- α (BHATIA, 2002; COHEN, 2002) e tem sido considerada como marcador de gravidade da SDRA desencadeada por diferentes etiologias como sepse (REMICK et al., 2002) e pancreatite aguda (LESER et al., 1991). Além disso, estudos no nosso laboratório revelaram que o bloqueio das isoformas da NOs acarreta aumento de IL-6 na linfa durante o período de isquemia (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009). Vale lembrar que neste modelo o NO exerce importante papel na homeostasia e sobrevivência dos animais (CAVRIANI et al., 2004). Portanto, os altos níveis de IL-6 encontrados no explante pulmonar após a I/R intestinal podem modular a resposta inflamatória observada após 120 h do início da reperfusão.

Ainda no âmbito das citocinas, o VEGF também merece destaque por participar da regulação da permeabilidade vascular e da integridade endotelial na lesão pulmonar decorrente da I/R intestinal (MURA et al., 2006). Nossos estudos revelaram que, com o ducto linfático intacto, a I/R intestinal após 24 e 72 h não alterou os níveis de VEGF. Após 120 h de reperfusão intestinal com ducto linfático intacto, houve aumento dos níveis deste mediador em relação aos níveis basais. A obstrução do fluxo linfático neste grupo reduziu deste efeito.

Considerando seus efeitos vasculares, estes dados sugerem que o aumento da permeabilidade vascular pulmonar observada com 120 h de reperfusão intestinal pode estar relacionado com o aumento da quantidade de VEGF no pulmão dos animais. Vale lembrar que o VEGF é até 20.000 vezes mais potente que a histamina em aumentar a permeabilidade microvascular (DVORAK et al., 1995). Além disso, o bloqueio do ducto linfático nestes animais foi capaz de reduzir a quantidade de VEGF no meio de cultura dos explantes pulmonares o que poderia se associar a redução da permeabilidade vascular pulmonar, demonstrando relação entre estes dois eventos. Sabe-se ainda que o VEGF é secretado em resposta a estímulos pró-inflamatórios que podem induzir a SDRA, como o LPS e a elastase de neutrófilos (KOYAMA et al., 2002). Ainda, estudos clínicos sobre lesão pulmonar revelaram redução dos níveis de VEGF intrapulmonar nas primeiras fases da SDRA (MAITRE et al., 2001; THICKETT et al., 2002; ABADIE et al., 2005). Nossos dados não mostraram redução, mas não houve alteração nos níveis de VEGF no explante pulmonar dos animais I/R intestinal após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal.

Os mediadores lipídicos são potenciais candidatos para a regulação das alterações inflamatórias pulmonares induzidas pela I/R intestinal (SOUZA et al., 2000, CAVRIANI, 2007) e dentro do grupo dos eicosanóides, optamos por determinar a concentração de LTB₄ no meio de cultura dos explantes pulmonares. Nossos dados revelaram que 24 h, 72 h e 120 h após a reperfusão intestinal houve aumento significativo dos níveis de LTB₄. Fato também observado no explante dos animais do grupo sham com ducto linfático intacto. Todavia, o bloqueio do ducto nestes animais causou redução dos níveis deste eicosanóide. É interessante que os níveis aumentados de LTB₄ não se alteraram ao longo dos dias de reperfusão intestinal estudados nos animais I/R intestinal como ducto linfático intacto, mas que o bloqueio do fluxo linfático reduziu os níveis de LTB₄ nos animais I/R intestinal 72 h em relação aos animais I/R 24 h de reperfusão intestinal. O conjunto de dados nos sugere que o LTB₄ pode participar da inflamação pulmonar observada após a I/R intestinal, já que sua quantidade aumenta no explante pulmonar dos animais submetidos a este procedimento. Entre as alterações mediadas pelo LTB₄ podemos citar o aumento da permeabilidade vascular pulmonar e o recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação. O fato de o pulmão dos animais sham apresentarem uma quantidade maior de LTB₄ que a dos animais I/R intestinal pode sugerir que este, e outros mediadores, estão sendo liberados em resposta ao estresse cirúrgico e a alterações na homeostasia. De fato, o estresse cirúrgico por si só, pode desencadear a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por aumento na expressão de diversos mediadores como a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (MIYAOKA et al.,

2005). Além disso, Simmy et al. (2001) demonstraram que a manipulação do intestino induz alterações fisiológicas e ainda Thomas et al. (2002), mostraram que a laparotomia e a manipulação do intestino geram danos em órgãos distantes como o pulmão. Um aspecto interessante em nossos resultados é a observação de que após períodos prolongados da manipulação, o pulmão parece ainda ser sensível a geração de mediadores inflamatórios. Vale lembrar que de forma geral, o desenvolvimento de lesão pulmonar ocorre de maneira eficaz somente após a I/R intestinal.

A magnitude da resposta inflamatória é limitante para o organismo atingir o equilíbrio e manter as atividades vitais, sendo portanto, relevante o controle endógeno da inflamação. A IL-10 é descrita como potente citocina antiinflamatória que inibe a síntese de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , participando também da regulação da resposta imune humoral e atenuando o recrutamento de neutrófilos (SOUZA et al., 2003). Estudos realizados por Zingarelli et al. (2001) demonstraram que camundongos com deleção do gene da IL-10 são mais susceptíveis a lesões intestinais relacionadas à I/R intestinal. Além disso, pacientes com SDRA apresentam menor nível de IL-10 no sangue e no lavado broncoalveolar do que aqueles que têm risco, mas não desenvolvem a doença (ARMSTRONG et al., 1997). Nossos resultados revelaram aumento dos níveis desta citocina no explante de animais sham e I/R após 24 e 72 h de reperfusão intestinal em relação aos níveis basais sendo que a obstrução do fluxo linfático nos animais sham, mas não nos animais I/R, em ambos os períodos de reperfusão mencionados diminuiu a quantidade de IL-10 no explante pulmonar. Já os níveis deste mediador quantificados após 120 h de reperfusão intestinal não foram alterados em relação aos encontrados no explante dos animais do grupo basal e sham. Este último dado pode estar relacionado com a maior inflamação pulmonar encontrada neste período (120 h) já que a diminuição de IL-10 pode exacerbar a lesão tecidual devido ao aumento de TNF- α e IL-1 β nos tecidos e plasma. Tomados em conjunto, os dados sobre os mediadores liberados pelo pulmão após a I/R intestinal revelaram grandes concentrações de IL-6, VEGF e IL-10. Enquanto os níveis de IL-1 β e LTB₄ foram menores.

Com base em estudos *in vitro* sugerindo que as plaquetas, assim como os linfócitos, podem estar envolvidos no recrutamento de neutrófilos (KOGAKI et al., 1999; KIRTON e NASH, 2000), quantificamos estas células na tentativa de contribuir para o entendimento do modelo experimental. Os resultados mostraram que a I/R intestinal não alterou os valores de leucócitos no sangue dos animais. O número de leucócitos totais no sangue dos animais I/R intestinal também não se alterou ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados. A

análise diferencial dos leucócitos circulantes revelou que 24 h e 72 h após o início da reperfusão intestinal os animais com o ducto linfático intacto apresentaram valores de granulócitos semelhantes aos valores basais, mas 120 h após a reperfusão intestinal estes valores aumentaram significativamente. Além disso, o bloqueio do fluxo linfático foi capaz de aumentar os valores de granulócitos circulantes após todos os períodos de reperfusão intestinal estudados, mas não houve diferença entre os períodos. Estes dados podem eventualmente sugerir que o bloqueio do ducto linfático impede o fluxo de granulócitos pelo sistema linfático e estes acabam desviados para o sistema circulatório. Pode ainda haver liberação de corticóides, que causam aumento de leucócitos circulantes. Observamos que o número de linfócitos circulantes diminuiu após 24 h de reperfusão intestinal e não se alterou nos outros períodos estudados. O bloqueio do ducto linfático reduziu a quantidade de linfócito no sangue dos animais sham 24 h e I/R intestinal após 24 h e 120 h de reperfusão. A análise temporal mostrou aumento no número de linfócitos circulantes nos animais I/R 72 h com ducto linfático intacto em relação ao respectivo grupo I/R 24 h. No grupo com ducto bloqueado não houve alteração. Dados similares foram observados em relação ao número de monócitos circulantes, porém neste caso, o bloqueio do ducto linfático reduziu os valores de monócitos somente nos animais do grupo I/R 24 h e temporalmente, o número de monócitos circulantes nos animais I/R 24 h de reperfusão com ducto linfático intacto foi menor do que o encontrado nos animais do grupo I/R 120 h. Com base no exposto, podemos supor que linfócitos e monócitos estão presentes em menor quantidade no sangue dos animais submetidos a I/R intestinal na fase inicial da inflamação por estarem aderidos a tecidos ou ainda por uma falha no mecanismo de retro-alimentação da maturação e liberação destas células e que após períodos mais prolongados (72 e 120 h) ocorra uma normalização desta situação.

Durante a I/R ocorre a ativação de neutrófilos, aumento da produção de ácido araquidônico, de radicais livres, de citocinas, de peptídeos endoteliais, de NO e de moléculas de adesão, que afetam as funções das plaquetas (AYDEMIR-KOKSOY et al., 1999). Além disso, o acúmulo de plaquetas observado no intestino após a isquemia sugere importante papel destas células na patogênese da I/R intestinal (MASSBERG et al., 1998). Nossos resultados revelaram diminuição do número de plaquetas no sangue dos animais do grupo I/R 24 h independentemente do bloqueio ao não do ducto linfático em relação aos animais dos grupos sham e basal. Em contrapartida, houve aumento da quantidade de plaquetas circulantes nos animais do grupo I/R 120 h com ducto intacto em relação ao encontrado nos animais dos grupos sham e basal. Além disso, o bloqueio do ducto linfático neste grupo de animais

reverteu o aumento. A análise temporal dos efeitos da I/R intestinal revelou aumento progressivo na quantidade de plaquetas circulantes nos animais com ducto linfático intacto. Também observamos aumento de plaquetas após 72 h e 120 h nos animais com ducto linfático obstruído em relação aos animais reperfundidos por 24 h. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por Massberg et al (1998). Esses autores atribuem a diminuição do número de plaquetas circulantes nos animais do grupo I/R nas primeiras 2 h horas de reperfusão ao fato destas plaquetas estarem aderidas ao tecido intestinal. Esta resposta inicial parece ser mediada pela P-selectina, porém a cinética da expressão desta molécula sugere ainda que ela apresenta picos de expressão após 8 h de reperfusão o que levanta a hipótese de um aumento na agregação plaquetária dependente do tempo de reperfusão intestinal (EPPIHIMER et al., 1997). Além disso, o aumento do número de plaquetas circulantes observado após 120 h reperfusão intestinal pode ser atribuído ao fato de que os leucócitos podem ativar as plaquetas (COOPER et al., 2004), e como neste período de reperfusão intestinal observamos aumento na atividade de MPO pulmonar, é possível que haja interação dessas células. Aliás, a interação plaqueta-leucócito tem sido freqüentemente observada na microcirculação de tecidos pós isquemia (MASSBERG et al., 1998, OSMAN et al., 2009) e parece ser também mediada pela P-selectina (KOGAKI et al., 1999). Outro fato a se considerar é que as plaquetas podem causar vasoconstrição pela liberação de serotonina (BERTONI et al., 2007) e tromboxana A₂ (SLUPSKI et al., 2006) o que pode contribuir para a hipotensão (CARDEN e GRANGER, 2000) e hiporreatividade vascular pulmonar (COELHO et al., 2007) observada após a I/R intestinal.

Em relação ao perfil hematológico traçado neste trabalho avaliamos também o hematócrito dos animais após a I/R intestinal. O hematócrito representa a porção de eritrócitos em relação ao volume total de sangue. A retenção de fluidos pode expandir o volume de plasma e reduzir o hematócrito. Nossos dados revelaram diminuição do hematócrito após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal no grupo I/R intestinal com ducto linfático intacto em relação aos valores basais. Após 120 h de reperfusão intestinal observamos normalização do hematócrito. Sabe-se que mediadores inflamatórios liberados durante a I/R intestinal afetam a coagulação (AYDEMIR-KOKSOY, et al., 1999). Observações do nosso laboratório revelam que após 2 h de reperfusão intestinal (dados não mostrados) o sangue dos animais se torna mais viscoso, possivelmente devido à intensa coagulação sistêmica, porém ao longo do tempo de reperfusão intestinal este fenômeno não é observado, mas nossos dados revelam que ainda existe diminuição do hematócrito após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal, e que somente após 120 h ele retorna aos valores basais.

Estudos do nosso laboratório (BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009) e aqueles descritos para modelos de eventos traumáticos (DEITCH et al., 2001; DAVIDSON et al., 2004), revelam que a interação de neutrófilos com a parede vascular altera a funcionalidade das células endoteliais e que eventos isquêmicos causam aumento de aderência de neutrófilos ao endotélio pulmonar, sendo a lesão microvascular pulmonar um dos eventos críticos decorrentes da I/R intestinal. Por conta disso, investigamos a expressão de diversas moléculas presentes no endotélio pulmonar de animais submetidos a diferentes períodos de reperfusão intestinal. É sabido que em condições de I/R tecidual, neutrófilos deixam a circulação e migram para regiões lesadas. Desta forma, é razoável supor que os componentes celulares que orquestram a adesividade e a diapedese estejam ativados. De fato, os mecanismos envolvidos com o recrutamento celular incluem etapas nas quais os leucócitos, após o *rolling*, aderem firmemente ao endotélio e migram através do subendotélio e tecido extravascular. Dentre as moléculas de adesão que participam do processo de rolamento dos leucócitos, a P-selectina, presente nas plaquetas e no endotélio, é armazenada, juntamente com o vWf, nos corpos de Weibel-Palade (ROSEN, 2004). Se a célula endotelial for exposta a substâncias que estimulem a liberação de cálcio ou aumento do AMPc, como histamina ou citocinas liberadas durante a sepse e a inflamação, o vWf é rapidamente secretado (HAMILTON e SIMS, 1987; LEVINE et al., 1982) e a P-selectina é liberada para a superfície da célula endotelial onde irá exercer importantes papéis na homeostase vascular e na inflamação, participando dos processos de agregação plaquetária e rolamento dos leucócitos pelo endotélio ativado (ROMANI DE WIT e VAN MOURIK, 2001; ANDRE et al., 2000). De fato, Denis e colaboradores (2001) demonstraram que em camundongos deficientes de vWf, e consequentemente sem a presença dos corpúsculos de Weibel-Palade, os leucócitos não eram eficientemente recrutados devido a falta de P-selectina. Na circulação, o antígeno vWf vem sendo utilizado como marcador de lesão endotelial, principalmente na injúria pulmonar aguda e SDRA (RUBIN et al., 1990; SABHARWAL et al., 1995; SIEMIATKOWSKI et al., 2000; WARE, 2004). Nossos dados estão de acordo com os dados encontrados na literatura uma vez que observamos redução da expressão de vWf no endotélio pulmonar dos animais reperfundidos por 120 h em relação aos valores basais e aos valores expressos pelo endotélio dos animais reperfundidos por 24 h e 72 h. Esta redução poderia estar relacionada à liberação do vWf na circulação após estímulos inflamatórios observados neste período de reperfusão intestinal. Vale lembrar que após 120 h de reperfusão intestinal também observamos aumento da MPO pulmonar, o que pode se relacionar com a P-selectina mobilizada para o endotélio pulmonar promovendo maior adesão e consequentemente migração de neutrófilos para o

pulmão. Outro fato observado em relação ao vWf nos vasos pulmonares foi o aumento da expressão desta molécula no endotélio dos animais do grupo I/R com ducto bloqueado em todos os períodos de reperfusão intestinal estudados. Este dado pode estar relacionado com o fato de que o bloqueio do ducto linfático atenua a inflamação pulmonar observada após a I/R intestinal. Uma maneira de avaliar esta hipótese seria quantificando os níveis circulantes de vWf.

Na etapa de adesão dos leucócitos, as integrinas, uma família de receptores heterodiméricos, têm importante papel, favorecendo os eventos mediados pelas selectinas e interagindo com componentes da matriz extracelular (STEEBER et al., 2005). As integrinas que contém a subunidades β_1 participam da adesão de neutrófilos a componentes da matriz extracelular subendotelial (LIU et al., 2008), apresentando assim importante papel no recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória. Nossos dados indicaram que 120 h após o início da reperfusão intestinal a expressão desta integrina no endotélio de animais com ducto intacto foi maior que a observada no grupo basal e nos animais reperfundidos por 24 h. É interessante notar que neste período (120 h) também verificamos aumento da MPO pulmonar. No conjunto, o aumento da expressão de integrina β_1 no endotélio pulmonar destes animais pode favorecer a adesão, transmigração e recrutamento de neutrófilos para o pulmão. Por outro lado, nossos dados ainda não permitem identificar a sinalização responsável pelo aumento tardio (após 120 h) da expressão de integrina β_1 . Uma vez aderidos ao endotélio, os leucócitos devem migrar para o local da inflamação. Uma molécula importante neste processo é a PECAM-1. Esta molécula pertence à família das imunoglobulinas e está envolvida com a ligação homofílica entre as células endoteliais e a transmigração celular durante a inflamação e a injúria decorrente de I/R (ALBELDA et al., 1991; BOGEN et al., 1994; MUROHARA et al., 1996; MULLER, 2003; BREITHAUPT-FALOPPA et al., 2009). Como o conhecimento dos mecanismos que regulam estes processos pode ser importante ferramenta para o controle da reação inflamatória e das lesões teciduais, resolvemos investigar se havia alterações na expressão desta molécula nos vasos pulmonares após a I/R intestinal. Nossos dados revelaram que após 24 h e 72 h de reperfusão intestinal houve diminuição da expressão de PECAM-1 no endotélio pulmonar dos animais I/R e que após 120 h estes valores não se alteraram em relação aos valores basais. Vale lembrar que esta redução foi observada em animais com o ducto linfático intacto. Já no grupo com ducto linfático obstruído, o inverso aconteceu, após 24 h e 72 h não houve alteração e com 120 h de reperfusão intestinal houve redução da expressão de PECAM-1 no endotélio pulmonar dos animais. A análise temporal dos efeitos da

I/R intestinal revelou maior expressão de PECAM-1 nos vasos pulmonares após 120 h do início da reperfusão intestinal em comparação aos animais reperfundidos por 24 h e 72 h. Estes dados podem justificar a ausência de recrutamento de neutrófilos para o pulmão nos períodos 24 h e 72 h de reperfusão intestinal, podendo sugerir também que não houve adesão ou migração de neutrófilos para o pulmão. Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o bloqueio da PECAM-1 com anticorpo reduz o acúmulo de neutrófilos em tecidos inflamados (VAPORCIYAN et al., 1993), a inflamação aguda (BOGEN et al., 1994), a transmigração celular em culturas de células endoteliais (MULLER, 2003) e ainda protege o miocárdio de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão (MUROHARA et al., 1996). Outro fato interessante é que, após 120 h de reperfusão intestinal (com ducto intacto) observamos inflamação pulmonar caracterizada pelo aumento na MPO. Estes dados nos permitem sugerir uma relação com a expressão de PECAM-1. É interessante notar que na vigência de estímulos inflamatórios, a expressão de PECAM-1 pode aumentar via ativação do NF- κ B (BOTELLA et al., 2000). Nós não temos dados referentes à expressão do NF- κ B em nosso modelo experimental, mas existem estudos indicando a participação desse fator em modelo de I/R intestinal (GIAKoustidis et al., 2008; SOUZA et al., 2005; NICHOLS, 2004). Tomados em conjunto, os dados apresentados sugerem que o controle da expressão de PECAM-1 é importante na cascata inflamatória e que uma intervenção em sua expressão pode ser crucial na prevenção dos danos teciduais causados pela I/R intestinal.

Está bem estabelecido que além do aumento de neutrófilos, o aumento da permeabilidade microvascular e o edema também estão relacionados com as repercussões da I/R intestinal. Muitas das condições que aumentam a permeabilidade vascular afetam também a organização de junções aderentes. Estas junções possuem a função de manter a integridade da barreira endotelial. Entre as junções aderentes, destacamos a VE-caderina, que se localiza especificamente nas junções endoteliais (LAMPUGNANI et al., 1992) e é fosforilada pelo VEGF. Além deste último, outras substâncias que promovem o aumento da permeabilidade vascular, como a histamina, o PAF e até mesmo neutrófilos ativados podem fosforilar a VE-caderina (SHASBY et al., 2002; HUDRY-CLERGEON et al., 2005; TINSLEY et al., 1999). A fosforilação, a clivagem e a internalização da VE-caderina além de afetarem a permeabilidade endotelial também induzem adesão de leucócitos ao endotélio numa ação mediada pela ICAM (ALLINGHAM et al., 2007; TUROWSKI et al., 2008). Visto que em nosso modelo observamos aumento da permeabilidade microvascular pulmonar e aumento dos níveis de VEGF no explante pulmonar dos animais após 120 h de reperfusão intestinal, decidimos investigar a expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar de animais

submetidos a I/R intestinal. De forma geral, a I/R intestinal promoveu aumento na expressão de VE-caderina no endotélio pulmonar em todos os períodos de reperfusão intestinal estudados. Temporalmente, observamos aumento na expressão desta molécula no grupo com o ducto intacto após 120 h de reperfusão intestinal em relação ao observado após 72 h. Aparentemente, a obstrução do fluxo linfático não alterou o curso temporal da expressão de VE-caderina. Considerando que a resposta inflamatória é um mecanismo de defesa, é razoável supor que o aumento da expressão de VE-caderina após a I/R intestinal propicie a resposta indutora de recrutamento de neutrófilos e de aumento da permeabilidade vascular em busca da homeostasia.

O recrutamento de leucócitos e o edema pulmonar resultantes de uma lesão podem ser indícios de desestruturação das barreiras epiteliais e endoteliais. A resolução da inflamação e a reparação tecidual são essenciais para a manutenção da integridade destas barreiras. As proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, o colágeno e a laminina têm demonstrado importante papel nestes processos (WILSON e WYNN, 2009). A fibronectina, uma glicoproteína adesiva que nos pulmões é encontrada abundantemente entre as células endoteliais e a membrana basal, contribui para a integridade estrutural da barreira capilar-alvéolo (TORIKATA et al., 1985), bem como participa da migração celular, organização e reparação tecidual (ROMAN, 1996). Como a fibronectina vem sendo implicada na fisiopatologia da lesão pulmonar e na sua reparação por meio do remodelamento tecidual, decidimos investigar a expressão desta molécula no pulmão de animais submetidos I/R intestinal. Nossos dados demonstraram que a I/R intestinal e a falsa-operação, no grupo de animais com o ducto intacto, aumentou a expressão de fibronectina no pulmão dos animais em todos os períodos estudados em relação à expressão basal desta molécula. Observamos ainda que o bloqueio do ducto linfático nos animais dos grupos I/R 24 h e 72 h, mas não no grupo I/R 120 h, preveniu este aumento. A análise temporal da expressão de fibronectina no pulmão dos animais isquêmicos e reperfundidos revelou que não houve alteração da expressão desta glicoproteína ao longo dos períodos de reperfusão intestinal estudados. Em conjunto nossos dados sugerem que as alterações no endotélio pulmonar causadas pela I/R intestinal, e que são prevenidas em parte pelo bloqueio do ducto torácico linfático, podem aumentar a adesão da fibronectina plasmática à matriz endotelial lesada na tentativa de manter sua integridade. De fato, diversos estudos demonstram que a lesão pulmonar é acompanhada de redução da fibronectina plasmática e consequentemente aumento de sua expressão no tecido lesado (BRIEN et al., 1998; BELLOWS e BRAIN, 2003). Além disso, o fato de não termos encontrado alterações na expressão desta molécula ao longo dos períodos de

reperfusão intestinal estudados pode estar relacionado com o que foi descrito por Toews (1999) e Idell (2003). Estes autores demonstram que o remodelamento tecidual, um componente da reparação, acontece na lesão pulmonar aguda e crônica e que apesar de ter sido sempre considerado uma consequência tardia da resposta inflamatória, evidências sugerem que ele é ativado rapidamente após a lesão, e que este remodelamento pode acontecer sem alterar a arquitetura pulmonar. Uma forma de averiguar este fato seria avaliar a expressão de fibronectina com 2 h de reperfusão intestinal.

Outra proteína da matriz extracelular importante no processo de reparação/remodelamento é o colágeno. O colágeno é o principal componente da matriz vascular. O mais abundante em humanos é o tipo I, compondo as fibras da matriz extracelular de ossos, tendões, pele e outros tecidos (PROCKOP e KIVIRIKKO, 1995; KADLER et al., 2007). Já o colágeno tipo IV, é um dos principais componentes da membrana basal de muitos tecidos, inclusive dos pulmões (RAINES, 2000). Na fase de remodelação, células inflamatórias, células do parênquima e componentes da matriz secretam TGF- β ativando os fibroblastos (DESMOULIÈRE et al., 2003 e HINZ et al., 2007). Estes são convertidos em miofibroblastos que sintetizam nova matriz formada principalmente por colágeno (DESMOULIÈRE et al., 1995). Nossos resultados revelaram que a I/R intestinal, assim como a falsa-operação, promoveram aumento na expressão destes dois tipos de colágeno em todos os períodos estudados. E que somente nos animais reperfundidos por 120 h houve diferença entre o grupo I/R intestinal e sham. Estes dados sugerem que a manipulação do intestino pode estimular a expressão de colágeno. Além disso, observamos que o aumento na expressão de colágeno tipo I e IV foi maior nos animais reperfundidos por 120 h do que o observado nos períodos de reperfusão anteriores. Fato que pode estar relacionado com uma maior lesão epitelial/endotelial ocasionada pela exacerbação da inflamação pulmonar observada neste mesmo período de reperfusão intestinal. De fato, Skold et al. (1999) demonstram, em um estudo *in vitro*, que a co-cultura de fibroblastos e neutrófilos aumenta significativamente a contração do colágeno, sugerindo que a interação entre neutrófilos e fibroblastos está intimamente relacionada com a deposição de colágeno. Além disso, como a IL-10 pode agir diretamente em fibroblastos e reduzir a produção de colágeno induzida por TGF- β (ARAI et al., 2000), podemos sugerir que a redução de IL-10 observada no explante pulmonar dos animais reperfundidos por 120 h poderia contribuir para o aumento da deposição de colágeno no endotélio pulmonar destes animais. Outro fato interessante observado na expressão de colágeno tipo IV foi a redução de sua expressão no endotélio pulmonar dos animais I/R com o ducto linfático obstruído em relação aos animais com o ducto intacto. Este resultado pode

sugerir que o bloqueio do ducto linfático reduz o grau de lesão da membrana basal dos pulmões e consequentemente exige um processo de reparação menor. Nesse sentido, mediadores envolvidos com o aumento da expressão deste tipo de colágeno não teriam acesso aos pulmões devido à obstrução do fluxo linfático.

Dando sequência aos estudos sobre os efeitos tardios da I/R intestinal, observamos que após 120 h do início da reperfusão intestinal ocorre uma nova onda inflamatória no pulmão. Acreditamos que este evento possa estar relacionado com os mecanismos acionados pelo organismo ao longo dos dias para modular a inflamação. Baseados nos dados obtidos após 120 h do início da reperfusão intestinal, sugerimos que no transcorrer dos dias alguma alteração na imunidade dos animais possa ocorrer. É interessante notar que pacientes com SDRA que sobrevivem à inflamação pulmonar inicial podem morrer devido a segundos estímulos como infecção ou trauma (BHATIA e MOOCHHALA, 2004; BUTT e SHRESTHA, 2008). Admite-se que lesões iniciais graves, como na I/R intestinal, acarretam deterioração do sistema imune inato e adaptativo causando um quadro de imunossupressão (FLOHÉ et al., 2008). Nestas condições, o risco de infecções no tecido lesado aumenta (KALICKE et al., 2003). Em nossos estudos, a lesão pulmonar desencadeada pelo trauma intestinal poderia ser exacerbada após infecção. De fato, neutrófilos presentes no pulmão promovem influxo adicional de células inflamatórias (LOMAS et al., 2003). Além da indução de lesão tecidual, o controle endógeno da resposta inflamatória, como a liberação de IL-10, aumenta o risco de infecções. Nestes casos, uma resposta imune efetiva contra a infecção requer a interação coordenada de células apresentadoras de antígeno (APCs) e células T (FLOHÉ et al., 2008). No caso do trauma, o que se observa é que macrófagos peritoneais e esplênicos reduzem os níveis de moléculas MHC classe II em sua superfície (AYALA et al., 1990) e têm sua capacidade de liberar IL-12 deprimida. Em conjunto, estes eventos prejudicam o desenvolvimento de resposta Th1 (MCCARTER et al., 1998). Como este tipo de resposta é essencial para a eliminação bacteriana, visto que o IFN- γ ativa fagócitos que eliminarão os microorganismos, uma inibição da resposta Th1 poderia acarretar disseminação irrestrita de bactérias. Nossos resultados parecem reforçar a hipótese de imunossupressão sugerida Flohé et al. (2008). De fato, animais do grupo I/R 120 h apresentaram exacerbação da lesão pulmonar. Mack et al. (1996) mostraram que a supressão da geração e da liberação de citocinas tipo Th1 em modelo hemorrágico surge a partir de 7 dias da indução da lesão. De maneira a avaliar possíveis estímulos bacterianos, tratamos os animais com antibiótico de amplo espectro. O protocolo de tratamento consistiu da administração do antibiótico em diferentes períodos da indução da I/R intestinal. Assim, os animais foram tratados 1 h antes da

indução da isquemia intestinal, logo após o término da isquemia e após 1 h e 96 h do início da reperfusão intestinal. Os estudos foram conduzidos 120 h após o início da reperfusão.

Nossos resultados revelaram que o tratamento profilático, bem como os tratamentos realizados após a isquemia e 96 h após o início da reperfusão intestinal, em animais com o ducto intacto, preveniram o aumento da MPO pulmonar. Em contraste, o tratamento realizado após 1 h do início da reperfusão intestinal reduziu a MPO. Todavia, esta redução foi de menor intensidade que a observada com os outros tratamentos. Em relação à permeabilidade vascular pulmonar nos animais com ducto linfático íntegro, os tratamentos realizados antes e após a isquemia intestinal preveniram o aumento do extravasamento plasmático pulmonar, enquanto os tratamentos feitos 1 h e 96 h após a reperfusão intestinal reduziram o aumento da PV, porém não de maneira tão eficaz quanto os outros tratamentos. Com respeito ao intestino, apenas o tratamento realizado 1 h após o início da reperfusão intestinal não preveniu o aumento da permeabilidade microvascular intestinal. Estes resultados indicam que de alguma forma, uma infecção pode ser o segundo estímulo responsável pela nova onda inflamatória observada após 120 h de reperfusão intestinal. Desta maneira, sugerimos que a infecção pode ser causada pela translocação bacteriana ocasionada pela I/R intestinal. De fato, durante a isquemia intestinal a diminuição da oxigenação tecidual promove acidose da mucosa, aumento da permeabilidade e consequentemente injúria epitelial. Quando a reperfusão intestinal tem início, a lesão tecidual pode ser exacerbada levando à lesão microvascular, apoptose e necrose (BALZAN et al., 2007). Desta forma, a I/R intestinal poderia causar ruptura da barreira da mucosa intestinal, permitindo que bactérias intestinais e endotoxinas atravessassem esta barreira e entrem em contato com enterócitos e células do sistema imunológico intestinal ativando uma resposta inflamatória no intestino (DEITCH et al., 2002; WIEST et al., 2003). É interessante notar que bactérias podem iniciar ou potencializar a lesão em órgãos distantes mesmo quando estão restritas ao interior do intestino ou nos gânglios intestinais e não atingem a circulação sistêmica (DEITCH et al., 2002). Tal evento ocorre porque podem induzir o mesmo padrão de liberação de citocinas e quimionas observadas na inflamação estéril (MOLLEN et al., 2006). Nessa linha de pensamento, os tratamentos antes da I/R intestinal e após a isquemia seriam capazes de prevenir a translocação bacteriana e o desenvolvimento de infecção que poderia ocasionar inflamação pulmonar após 120 h de reperfusão intestinal. Apesar do mencionado, quando o tratamento é feito após 96 h do início da reperfusão intestinal observamos resolução da infiltração de neutrófilos para o pulmão e da permeabilidade intestinal observada após 120 h de reperfusão. Estes dados são de difícil interpretação, todavia, sugerimos que isso ocorra porque a presença de bactérias e produtos de

células sob estresse no organismo pode ativar as chamadas alarminas, como por exemplo, o HMGB1 e HSPs (para revisão ver FLOHÉ et al., 2008). Estas alarminas por possuírem atividade microbiciada e serem capazes de ativar células do sistema imune podem desencadear uma resposta para reestabelecer a homeostase. Porém, se o organismo estiver imunossuprimido, o retorno à homeostasia pode requerer intervenções externas. Em nosso estudo, o uso do antibiótico após 96 h de reperfusão intestinal poderia favorecer a atividade microbiciada mediada pelas alarminas e contribuir no controle da inflamação. Todavia, o tratamento após 1 h do início da reperfusão intestinal atenuou, mas não preveniu a inflamação pulmonar. Acreditamos que isso possa ter ocorrido porque o processo de translocação tenha se iniciado na primeira hora de reperfusão intestinal, assim, o uso do antibiótico nesta fase poderia ter impedido o acionamento das alarminas que medeiam o combate às bactérias. Com isso, um importante componente no controle da infecção e na busca pela homeostasia pode ter sido inativado, permitindo que bactérias restantes causassem infecção, a qual não pôde ser controlada pelo organismo imunossuprimido, justificando a inflamação pulmonar moderada. Outro fato a se considerar seria o meio ambiente. Como os animais após a I/R intestinal retornam ao biotério até que o período de reperfusão esteja completo, e sendo este biotério não estéril e com a presença de outros animais, é possível que fatores presentes no ambiente, como bactérias, possam contribuir para a infecção observada após a I/R intestinal. Uma maneira de comprovar a teoria da translocação bacteriana seria a realização de hemocultura.

Encerrando nossos estudos, avaliamos a taxa de sobrevivência após a I/R intestinal. Isso porque a I/R intestinal é importante fator de risco para o desencadeamento de lesões teciduais generalizadas geralmente fatais. Observamos que, embora a laparotomia e a manipulação do intestino realizadas nos animais sham sejam capazes de alterar os níveis de algumas citocinas no explante pulmonar, a quantidade de células no sangue, e a expressão de moléculas endoteliais, estas alterações não são potencialmente fatais, pois a porcentagem de mortalidade entre os animais deste grupo é praticamente zero. Já os animais I/R intestinal, apresentaram mortalidade, nas primeiras 24 h de reperfusão intestinal, em torno de 50%. Além disso, o bloqueio do ducto linfático previamente à indução da isquemia intestinal gera maior mortalidade. Provavelmente devido ao duplo estresse cirúrgico.

Finalmente, os dados apresentados neste estudo revelam que a I/R intestinal desencadeia efeitos tardios associados à indução de inflamação pulmonar possivelmente mediada por fatores presentes na linfa e no pulmão e também por moléculas endoteliais e proteínas da matriz extracelular. É possível que a perda na qualidade do controle endógeno da

inflamação medeia as alterações pulmonares tardias onde a presença de bactérias pode exercer papel relevante.

6 Conclusões

- A I/R intestinal promove alterações no pulmão e no intestino dependentes do tempo de reperfusão intestinal.
- Os efeitos tardios da I/R intestinal no pulmão são caracterizados pela presença de neutrófilos e aumento de extravasamento protéico. No intestino, a I/R intestinal causa aumento de permeabilidade vascular.
- A presença de IL-1 β , IL-6, VEGF e LTB₄ na linfa, após diferentes períodos de reperfusão intestinal e a variação de seus níveis ao longo dos períodos de reperfusão, sugerem que o intestino contribui com a inflamação tardia no pulmão.
- Mediadores inflamatórios gerados no intestino podem estimular o pulmão a gerar ondas adicionais de mediadores (IL-1 β , IL-6, VEGF, LTB₄ e IL-10) contribuindo para a inflamação pulmonar tardia observada 120 h após o início da reperfusão intestinal.
- As repercussões tardias da I/R intestinal podem ser causadas por falha no mecanismo de controle endógeno da resposta inflamatória, onde a redução de IL-10 e aumento de IL-1 β e de VEGF no explante pulmonar podem ser relevantes.
- A I/R intestinal promove alterações no endotélio pulmonar modulando a expressão de moléculas relacionadas com a adesão e migração de leucócitos para o pulmão e com a manutenção da integridade endotelial.
- A inflamação pulmonar tardia parece ser ocasionada por infecção bacteriana associada a mecanismos imunossupressores.

- Considerando a inflamação tardia, os dados apresentados neste estudo podem sugerir a importância do monitoramento (sistêmico e/ou pulmonar) de mediadores inflamatórios por períodos prolongados após a normalização da perfusão tecidual em quadros isquêmicos a fim de se obter medidas que visem o controle da resposta inflamatória pulmonar causada por potenciais quadros de imunossupressão.

*Referências Bibliográficas

ABADIE, Y.; BREGEON, F.; PAPAIZIAN, L. Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. **Eur. Respir. J.**, v. 25, p. 139–146, 2005.

ALBELDA, S. M.; MULLER, W. A.; BUCK, C. A.; NEWMAN, P. J. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. **J. Cell Biol.**, v. 114, p. 1059–1068, 1991.

ALLINGHAM, M. J.; VAN BUUL, J. D.; BURRIDGE, K. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. **J. Immunol.**, v. 179, p. 4053–4064, 2007.

ANDRE, P.; DENIS, C. V.; WARE, J.; SAFFARIPOUR, S.; HYNES, R. O.; RUGGERI, Z. M.; WAGNER, D. D. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. **Blood**, v. 96, p. 3322–3328, 2000.

APRAHAMIAN, C. J.; LORENZ, R. G.; HARMON, C. M.; DIMMIT, R. A. Toll-like receptor 2 is protective of ischemia-reperfusion-mediated small-bowel injury in a murine model. **Pediatr. Crit. Care Med.**, v. 9, n. 1, p. 105–109, 2008.

ARAI, T.; ABE, K.; MATSUOKA, H.; YOSHIDA, M.; MORI, M.; GOYA, S.; KIDA, H.; NISHINO, K.; OSAKI, T.; TACHIBANA, I.; KANEDA, Y.; HAYASHI, S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. **Am. J. Physiol.**, v. 278, p. L914 – L922, 2000.

ARAKAWA, K.; TAKEYOSHI, I.; MURAOKA, M.; MATSUMOTO, K.; MORISHITA, Y. Measuring platelet aggregation to estimate small intestinal ischemia-reperfusion injury. **J. Surg. Res.**, v. 122, n. 2, p. 195–200, 2004.

ARMSTRONG, L.; MILLA, A. B. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. **Thorax**, v. 52, p. 442–446, 1997.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências. Rio de Janeiro, 2002.

AYALA, A.; PERRIN, M. M.; CHAUDRY, I. H. Defective macrophage antigen presentation following haemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens. **Immunology**, v. 70, p. 33–39, 1990.

AYDEMIR-KOKSOY, A.; KOKSOY, C.; KUZU, M. A.; DEMIRPENCE, E.; CINEL, I.; KESENCI, M.; YAVUZER, S. Intestinal ischemia-reperfusion leads to platelet dysfunction. **Thromb. Res.**, v. 94, n. 6, p. 395-400, 1999.

BALZAN, S., DE ALMEIDA QUADROS, C.; DE CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, n. 4, p.464-471, 2007.

BARNES, P. J. Molecular basis for corticosteroid action in asthma. **Chem. Immunol.**, v. 78, p. 72-80, 2000.

BELLOWS, C. F.; BRAIN, J. D. Role of fibronectin in pancreatitis-associated lung injury. **Dig. Dis. Sci.**, v. 48, n. 8, p. 1445-1450, 2003.

BERNARD, G. R. Acute respiratory distress syndrome: a historical perspective. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 172, n. 7, p. 798-806, 2005.

BERTHIAUME, Y.; LESUR, O.; DAGENAIS, A. Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium. **Thorax**, v. 54, v. 2, p. 150-160, 1999.

BERTONI, S.; GHIZZARDI, P.; CATTARUZZA, F.; BALLABENI, V.; IMPICCIATORE, M.; TOGNOLINI, M.; LAGRASTA, C. A.; BAROCELLI, E. Evidence for the involvement of 5-HT_{2A} receptors in mild mesenteric ischemia/reperfusion dysfunctions in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 56, n. 6, p. 550-55, 2007.

BHATIA, M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 1, p. 343–351, 2002.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **J. Pathol.**, v. 202, n. 2, p. 145-156, 2004.

BIFFL, W. L.; MOORE, E. E. Splanchnic ischaemia/reperfusion and multiple organ failure. **Br. J. Anaesth.**, v. 77, n. 1, p. 59-70, 1996.

BITTERMAN, P. B. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. **Am. J. Med.**, v. 92, p. 39S–43S, 1992.

BOGEN, S.; PAK, J.; GARIFALLOU, M.; DENG, X.; MULLER, W. A. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1059-1064, 1994.

BORJESSON, A.; NORLINA, A.; WANG, X.; ANDERSSON, R.; FOLKESSON, H. G. TNF-alfa stimulate alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Am. J. Pshysiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 278, p. L3-L12, 2000.

BOTELLA, L. M.; PUIG-KRÖGER, A.; ALMENDRO, N.; SÁNCHEZ-ELSNER, T.; MUÑOZ, E.; CORBÍ, A.; BERNABÉU, C. Identification of a functional NF-kappa B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. **J. Immunol.**, v. 164, n. 3, p. 1372-1378, 2000.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 330-339, 2004.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; KLEINHEINZ, J.; CRIVELLO, J. R. O. Endothelial cell reaction on a biological surface. **J. Biomed. Mat. Res. B. Appl. Biomat.**, v. 76, n. 1, p. 49-55, 2006.

BREITHAUPT-FALOPPA, A. C.; VITORETTI, L. B.; COELHO, F. R.; DOS SANTOS FRANCO, A. L.; DOMINGOS, H. V.; SUDO-HAYASHI, L. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TAVARES DE LIMA, W. Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult. **Shock**, v. 32, n. 1, p. 55-61, 2009.

BRIEN, T. P.; REDDY, P. P.; VINCENT, P. A.; LEWIS, E. P.; ROSS, J. S.; SABA, T. M. Lung matrix deposition of normal and alkylated plasma fibronectin: response to postsurgical sepsis. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. L432–L443, 1998.

BURLESON, B. S.; MAKI, E. D. Acute respiratory distress syndrome. **J. Pharmacy Pract.**, v. 18, p. 118–131, 2005.

BURNE, M. J.; DANIELS, F.; GHANDOUR, A.; MAUIYYEDI, S.; COLVIN, R. B.; O'DONNELL, M. P.; RABB, H. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 1283-90, 2001.

BUTT, I.; SHRESTHA, B. M. Two-hit hypothesis and multiple organ dysfunction syndrome. *J.N.M.A. J. Nepal Med. Assoc.*, v. 47, n. 170, p. 82-85, 2008.

CALDWELL, C. C.; TSCHOEP, J.; LENTSCH, A. B. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J. Leukoc. Boil.*, v. 82, p. 457-64, 2007.

CAMPBELL, N. B.; BLIKSLAGER, A. T. The role of cyclooxygenase inhibitors in repair of ischaemic-injured jejunal mucosa in the horse. *Equine Vet. J.*, Suppl., n. 32, p. 59-64, 2000.

CARDEN, D. L.; YOUNG, J. A.; GRANGER, D. N. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia reperfusion: role of P-selectin. *J. Appl. Physiol.*, v. 75, n. 6, p. 2529-2534, 1993.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury. *J. Pathol.*, v. 190, n. 3, p. 255-266, 2000.

CARMELIET, P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med.*, v. 255, n. 5, p. 538-561, 2004.

CATY, M. G.; GUICE, K. S.; OLDHAM, K. T.; REMICK, D. G.; KUNKEL, S. I. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann. Surg.*, v. 212, n. 6, p. 694-700, 1990.

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TREZENA, A. G.; DA SILVA, Z. L.; DOMINGOS, H. V.; DE ARRUDA, M. J.; JANCAR, S.; TAVARES DE LIMA, W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 494, n. 2-3, p. 241-249, 2004.

CAVRIANI, G.; DOMINGOS, H. V.; SOARES, A. L.; TREZENA, A. G.; LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SUDO-HAYASHI, L. S.; TAVARES DE LIMA, W. Lymphatic system as a path underlying the spread of lung and gut injury after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock*, v. 23, n. 4, p. 330-336, 2005.

CAVRIANI, G.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; SUDO-HAYASHI, L. S.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES DE LIMA, W. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1 β and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor α and nitric oxide. *Shock*, v. 27, n. 2, p. 209-213, 2007.

CAVRIANI, G. **Avaliação do envolvimento do sistema linfático na inflamação pulmonar causada pela isquemia e reperfusão intestinal**. 152 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CERQUEIRA, N. F; HUSSNI, C. A.; YOSHIDA, W. B. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, p. 336-343, 2005.

CHAVAKIS, T.; CINES, D. B.; RHEE, J. S.; LIANG, O. D.; SCHUBERT, U.; HAMMES, H. P.; HIGAZI, A. A.; NAWROTH, P.P.; PREISSNER, K.T.; BDEIR, K. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alphadefensins): a link between inflammation and angiogenesis. **FASEB J.**, v. 18, n. 11, p. 1306-1308, 2004.

CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. **Exp. Biol. Med.**, v. 234, p. 361-371, 2009.

CLARK, J. G.; MILBERG, J. A.; STEINBERG, K. P.; HUDSON, L. D. Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. **Ann. Int. Med.**, v. 122, p. 17-23, 1995.

COELHO, F. R.; CAVRIANI, G.; SOARES, A. L.; TEIXEIRA, S. A.; ALMEIDA, P. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; MUSCARA, M. N.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; VARGAFTIG, B. B.; TAVARES DE LIMA, W. Lymphatic-borne IL-1beta and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal i/r in rats. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 694-699, 2007.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-891, 2002.

COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **J Leukoc Biol.**, v. 77, v. 4, p. 487-595, 2005.

COOPER, D.; RUSSELL, J.; CHITMAN, K. D.; WILLIAMS, M. C.; WOLF, R. E.; GRANGER, D. N. Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n. 5, p. H1895-H1900, 2004.

CORBEL, M.; BOICHOT, E.; LAGENTE, V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 749-754, 2000.

DAMAS, P.; LEDOUX, D. N. Y. S. M.; VRINDTS, Y.; DE GROOTE, D.; FRANCHIMONT, P.; LAMY, M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann. Surg.*, v. 215, p. 356-362, 1992.

DAVIDSON, M. T.; DEITCH, E. A.; LU, Q.; HASKO, G.; ABUNGU, B.; NEMETH, Z. H.; ZAETS, S. B.; GASPERS, L. D.; THOMAS, A. P.; XU, D. Z. Trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph induces endothelial apoptosis that involves both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Ann. Surg.*, v. 240, n. 1, p. 123-131, 2004.

DEITCH, E. A.; ADAMS, C.; LU, Q.; XU, D. Z. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability. *Surgery*, v. 129, n. 1, p. 39-47, 2001.

DEITCH, E. A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery*, v. 131, n. 3, p. 241-244, 2002

DELISSER, H. M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; ROBINSON, C. S.; WEXLER, R. S.; KERR, J. S.; GARLANDA, C.; MERWIN, J. R.; MADRI, J. A.; ALBELDA, S. M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, v. 151, n. 3, p. 671-677, 1997.

DENIS, C. V.; ANDRE, P.; SAFFARIPOUR, S.; WAGNER, D. D. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 98, p. 4072-4077, 2001.

DESMOULIÈRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.*, v. 146, n. 1, p. 56-66, 1995.

DESMOULIÈRE, A.; DARBY, I. A.; GABBIANI, G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab. Invest.*, v. 83, p. 1689-1707, 2003.

DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, v. 146, p. 1029-1039, 1995.

EDGERTON, C.; CRISPÍN, J. C.; MORATZ, C. M.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; SIMOVIC, M.; ZACHARIA, A.; EGAN, R.; CHEN, J.; DALLE LUCCA, J. J.; JUANG, Y. T.; TSOKOS, G. C. IL-17 producing CD4+ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. **Clin Immunol.**, v. 130, n. 3, p.313-321, 2009.

ELIAS, C. G. 3RD; SPELLBERG, J. P.; KARAN-TAMIR, B.; LIN, C. H.; WANG, Y. J.; MCKENNA, P. J.; MULLER, W. A.; ZUKOWSKI, M. M.; ANDREW, D. P. Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 6, p. 1948-1958, 1998.

EPPIHIMER, M. J.; RUSSELL, J.; ANDERSON, D. C.; EPSTEIN, C. J.; LAROUX, S.; GRANGER, D. N. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 273, p. G1326–G1332, 1997.

FAN, Y.; YE, J.; SHEN, F.; ZHU, Y.; YEGHIAZARIANS, Y.; ZHU, W.; CHEN, Y.; LAWTON, M. T.; YOUNG, W. L.; YANG, G. Y. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 28, n. 1, p. 90-98, 2008.

FANOUS, M. Y.; PHILLIPS, A. J.; WINDSOR, J. A. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness. **JOP.**, v. 9, n. 4, p. 374-399, 2007.

FARMER, D. G.; MCDIARMID, S. V.; KUNIYOSHI, J.; ROBERT, M. E.; SHAKED, A.; BUSUTTIL, R. W. Intragraft expression of messenger RNA for interleukin-6 and tumor necrosis factor- α is a predictor of rat small intestine transplant rejection. **J. Surg. Res.**, v. 57, p. 138-142, 1994.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 795–803, 2002.

FILEP, J.; BRAQUET, P.; MOZES, T. Significance of platelet-activating factor in mesenteric ischemia-reperfusion. **Lipids**, v. 26, n. 12, p. 1336-1339, 1991.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, p. 3815-3822, 1991.

FLOHÉ, S. B.; FLOHÉ, S.; SCHADE, F. U. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. **Innate Immun.**, v. 14, n. 6, p. 333-344, 2008.

FOEX, B. Bacterial translocation in hemorrhagic shock: are we any wiser? **Crit. Care Med.**, v.33, p. 1166-1167, 2005.

FRIEDL, J.; PUHLMANN, M.; BARTLETT, D. L.; LIBUTTI, S. K.; TURNER, E. N.; GNANT, M. F.; ALEXANDER, H. R. Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF. **Blood**, v. 100, p. 1334–1339, 2002.

FUJIWARA, K. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. **J Intern Med.**, v. 259(4), p. 373-380, 2006.

GAINES, G. C.; WELBORN, M. B. III; MOLDAWER, L. L.; HUBER, T. S.; HARWARD, T. R.; SEEGER, J. M. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. **J. Vasc. Surg.**, v. 29, p. 370-376, 1999.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br. J. Anaesth.**, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004.

GALLUCCI, S. and MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 114-9, 2001.

GANEA, E.; TRIFAN, M.; LASLO, A. C.; PUTINA, G.; CRISTESCU C. Matrix metalloproteinases: useful and deleterious. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 689-691, 2007.
GEISER, T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury - a translational approach. **Swiss Med. Wkly.**, v. 133, v. 43-44, p. 586-590, 2003.

GIAKoustIDIS, A. E.; GIAKoustIDIS, D. E.; KOLIAKOU, K.; KALDRYMIDOU, E.; ILIADIS, S.; ANTONIADIS, N.; KONTOS, N.; PAPANIKOLAOU, V.; PAPAGEORGIOU, G.; ATMATZIDIS, K.; TAKOUDAS, D. Inhibition of intestinal ischemia/reperfusion induced apoptosis and necrosis via down-regulation of the NF- κ B, c-Jun and caspase-3 expression by epigallocatechin-3-gallate administration. **Free Radic Res.**, v. 42, n. 2, p. 180-188, 2008.

GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic Mechanisms of Postischemic Tissue Injury. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 311-332, 1995.

GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. G567-G574, 1986.

GROENEVELD, A. B.; RAIJMAKERS, P. G.; HACK, C. E.; THIJS, L. G. Interleukin 8-related neutrophil elastase and the severity of the adult respiratory distress syndrome. **Cytokine**, v. 7, n. 7, p. 746-752, 1995.

GROTZ, M. R.; DEITCH, E. A.; DING, J.; XU, D.; HUANG, Q.; REGEL, G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. **Ann. Surg.**, v. 229, p. 478-486, 1999.

HACK, C. E.; ZEERLEDER, S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. **Crit. Care Med.**, v. 29, Suppl n. 7, p. S21-S27, 2001.

HALLDORSSON, A. O.; KRONON, M. T.; ALLEN, B. S.; RAHMAN, S.; WANG, T. Lowering reperfusion pressure reduces the injury after pulmonary ischemia. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 69, n. 1, p. 198-203, 2000.

HAMILTON, K. K.; SIMS, P. J. Changes in Cytosolic Ca²⁺ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 600-608, 1987.

HANNAH, M. J.; WILLIAMS, R.; KAUR, J.; HEWLETT, L. J.; CUTTER, D. F.; Biogenesis of weibel-palade bodies. **Cell Develop. Biol.**, v. 13, p. 313-324, 2002.

HARWARD, T. R.; BROOKS, D. L.; FLYNN, T. C.; SEEGER, J. M. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. **J. Vasc. Surg.**, v. 18, n. 3, p. 459-467, 1993.

HIERHOLZER, C.; KALFF, J. C.; OMERT, L.; TSUKADA, K.; LOEFFERT, J. E.; WATKINS, S. C.; BILLIAR, T. R.; TWEARDY, D.J. Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. L611-L621, 1998.

HILL, J.; LINDSAY, T. F.; ORTIZ, F.; YEH, C. G.; HECHTMAN H. B.; MOORE F. D. JR. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. **J. Immunol.**, v. 149, n. 5, p. 1723-1728, 1992.

HINZ, B.; PHAN, S. H.; THANNICKAL, V. J.; GALLI A.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; GABBIANI, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. **Am. J. Pathol**, v. 170, p. 1807-1816, 2007.

HORIE, Y.; WOLF, R.; CHERVENAK, R. P.; JENNINGS, S. R.; GRANGER, D. N. T-lymphocytes contribute to hepatic leukostasis and hypoxic stress induced by gut ischemia/reperfusion. **Microcirculation**, v. 6, p. 267-80, 1999.

HUDRY-CLERGEON, H.; STENGE, D.; NINIO, E.; VILGRAIN, I. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. **FASEB J.**, v. 19, p. 512-520, 2005.

HUDSON, L. D.; MILBERG, J. A.; ANARDI, D.; MAUNDER, R. J. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, n. 2, p. 293-301, 1995.

HUDSON, L. D.; STEINBERG, K. P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. **Chest**, v. 116, Suppl n. 1, p. 74S-82S, 1999.

HURN, P. D.; SUBRAMANIAN, S.; PARKER, S. M.; AFENTOULIS, M. E.; KALER, L. J.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 27, p. 1798-1805, 2007.

IDELL, S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. **Crit. Care Med.**, v. 31S, p. S213-S220, 2003.

ISHII, H.; ISHIBASHI, M.; TAKAYAMA, M.; NISHIDA, T.; YOSHIDA, M. The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischaemia/reperfusion in rats. **Respirology**, v. 5, n. 4, p. 325-331, 2000.

JANUSZ, M. J.; DOHERTY, N. S. Degradation of cartilage matrix proteoglycan by human neutrophils involves both elastase and cathepsin **G. J Immunol.**, v. 146, n. 11, p. 3922-3928, 1991.

JOHNSTON, T. D.; FISCHER, R.; CHEN, Y.; REED, R. L. 2ND. Lung injury from gut ischemia: insensitivity to portal blood flow diversion. **J. Trauma**, v. 35, n. 4, p. 508-511, 1993.

KADLER, K. E.; BALDOCK, C.; BELLA, J.; BOOT-HANDFORD, R. P. Collagens at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 120, p. 1955-1958, 2007.

KALICKE, T.; SCHLEGEL, U.; PRINTZEN, G. Influence of a standardized closed soft tissue trauma on resistance to local infection. An experimental study in rats. **J. Orthop. Res.**, v. 21, p. 373–378, 2003.

KATO, T.; MURATA, A.; ISHIDA, H.; TODA, H.; TANAKA, N.; HAYASHIDA, H.; MONDEN, M.; MATSUURA, N. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1336-1340, 1995.

KIRTON, C. M.; NASH, G. B. Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. **J Lab. Clin. Med.**, v.136, p. 303–313, 2000.

KLEINHEINZ, J.; WIESMANN, H. P.; STRATMANN, U.; JOOS, U. Beurteilung der angiogenese und osteogenese unter dem einfluss von vascular endothelial growth factor (VEGF). **Mund. Kiefer GesichtsChir.**, v. 6, p. 175–182, 2002.

KOGAKI, S.; SAWA, Y.; SANO, T.; MATSUSHITA, T.; OHATA, T.; KUROTOBI, S.; TOJO, S. J.; MATSUDA, H.; OKADA, S. Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, p. 968–973, 1999.

KOIKE, K.; YAMAMOTO, Y.; HORI, Y.; ONO, T. Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. **Ann. Surg.**, v. 232, n. 1, p. 90-97, 2000.

KOKSOY, C.; KUZU, M. A.; KUZU, I.; ERGUN, H.; GURHAN, I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. **Br. J. Surg.**, v. 88, n. 3, p. 464-468, 2001.

KOYAMA, S.; SATO, E.; TSUKADAIRA, A. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro. **Eur. Respir. J.**, v. 20, p. 1449–1456, 2002.

KUZU, M. A.; KOKSOY, C.; KUZU, I.; GURHAN, I.; ERGUN, H.; DEMIRPENCE, E. Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. **Am. J. Surg.**, v. 183, n. 1, p. 70-74, 2002.

LAMPUGNANI, M. G.; RESNATI, M.; RAITERI, M.; PIGOTT, R.; PISACANE, A.; HOUEN, G.; RUCCO, L. P.; DEJANA. A novel endothelial-specific membrane protein is amarker of cell–cell contacts. **J. Cell Biol.**, v. 118, p. 1511–1522, 1992.

LEMJABBAR, H.; GOSSET, P.; LECHAPT-ZALCMAN, E.; FRANCO-MONTOYA, M. L.; WALLAERT, B.; HARF, A.; LAFUMA, C. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, v.20, p. 903–913, 1999.

LESER, H. G.; GROSS, C.; SCHEIBENBOGEN, C. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology*, v. 101, p. 782–785, 1991.

LESUR, O.; BERTHIAUME, Y.; BLAISE, G.; DAMAS, P.; DELAND, E.; GUIMOND, J. G.; MICHEL, R. P. Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. *Can. Respir J.*, v. 6, n. 1, p. 71-86, 1999.

LEVINE, J. D.; HARLAN, J. M.; HARKER, L. A.; JOSEPH, M. L. Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Blood*, v. 60, p. 531-534, 1982.

LEWANDOWSKI, K.; LEWANDOWSKI, M. Epidemiology of ARDS. *Minerva Anesthesiol.*, v. 76, p. 473-477, 2006.

LINFERT, D.; CHOWDHRY, T.; RABB, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev.*, v. 23, p. 1-10, 2009.

LIU, L.; SCHWARTZ, B.; TSUBOTA, Y.; RAINES, E.; KIYOKAWA, H.; YONEKAWA, K.; HARLAN, J. M.; SCHNAPP, L. M. Cyclin-dependent kinase inhibitors block leukocyte adhesion and migration. *J. Immunol.*, v. 180, n. 3, p. 1808-1817, 2008.

LOMAS, J. L.; CHUNG, C. S.; GRUTKOSKI, P. S. Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice. *Shock*, v. 19, p. 358–365, 2003.

LUCAS, S. The autopsy pathology of sepsis-related death. *Curr. Diagn. Pathol.*, v. 13, p. 375-88, 2007.

LUH, S. P.; CHIANG, C. H. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J. Zhejiang Univ. Sci B.*, v. 8, n. 1, p. 60-69, 2007.

MACK, V. E.; MCCARTER, M. D.; NAAMA, H. A. Dominance of Thelper 2-type cytokines after severe injury. **Arch. Surg.**, v. 131, p. 1303–1309, 1996.

MAGNOTTI, L. J.; UPPERMAN, J. S.; XU, D. Z.; LU, Q.; DEITCH, E. A. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. **Ann. Surg.**, v. 228(4), p. 518-527, 1998.

MAITRE, B.; BOUSSAT, S.; JEAN, D. Vascular endothelial growth factor synthesis in the acute phase of experimental and clinical lung injury. **Eur. Respir. J.**, v. 18, p. 100–106, 2001.

MANGINO, M. J.; MANGINO, J. E.; KOTADIS, B.; SIELCZAC, M. Effects of the 5-lipoxygenase A-64077 on intestinal hypothermic organ preservation injury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, n. 2, p. 950-956, 1997.

MARTIN, T. R. Cytokines and lung injury: searching for useful biomarkers. **Crit. Care Med.**, v.33, p. 230-232, 2005.

MASSBERG, S.; ENDERS, G.; LEIDERER, R.; EISENMENGER, S.; VESTWEBER, D.; KROMBACH, F.; MESSMER, K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. **Blood**, v. 92, p. 507–515, 1998.

MAXWELL, S. R. and LIP, G. Y. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **Int. J. Cardiol.**, v. 58, p. 95-117, 1997.

MCCARTER, M. D.; MACK, V. E.; DALY, J. M. Trauma-induced alterations in macrophage function. **Surgery**, v. 123, p. 96–101, 1998.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they are not just for matrix anymore! **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, n. 5, p. 534-540, 2001.

MCQUIBBAN, G. A.; GONG, J. H.; WONG, J. P.; WALLACE, J. L.; CLARK-LEWIS, I.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. **Blood**, v. 100, n.4, p. 1160–1167, 2002.

MICHAUX, G.; CUTLER, D. F. How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of weibel-palade bodies. **Traffic**, v. 5, p. 69–78, 2004.

MITSUOKA, H.; UNNO, N.; SAKURAI, T.; KANEKO, H.; SUZUKI, S.; KONNO, H.; TERAKAWA, S.; NAKAMURA S. Pathophysiological role of endothelins in pulmonary microcirculatory disorders due to intestinal ischemia and reperfusion. **J. Surg. Res.**, v. 87, n. 2, p. 143-151, 1999.

MIYAOKA, K.; IWASE, M.; SUZUKI, R.; KONDO, G.; WATANABE, H.; ITO, D.; NAGUMO, M. Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. **J. Surg. Res.**, v. 125, n. 2, p. 144-150, 2005.

MOLLEN, K. P.; ANAND, R. J.; TSUNG A.; PRINCE, J. M.; LEVY, R. M.; BILLIAR, T. R. Emerging paradigm: Toll like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. **Shock**, v. 26, p. 430-437, 2006.

MOORE, E. E.; MOORE, F. A.; FRANCIOSI, R. J.; KIM, F. J.; BIFFL, W. L.; BANERJEE, A. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. **J. Trauma**, v. 37, n. 6, p. 881-887, 1994.

MORAES, T. J.; CHOW, C. W.; DOWNEY, G. P. Proteases and lung injury. **Crit. Care Med.**, v. 31, n. 4, p. 189-194, 2003.

MOSES, T.; WAGNER, L.; FLEMING, S. D. TLR4-mediated Cox-2 expression increases intestinal ischemia/reperfusion-induced damage. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, n. 4, p. 971-980 2009.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 327-334, 2003.

MURA, M.; HANB; ANDRADE, C. F.; SETH, R.; HWANG, D.; WADDELL, T. K.; KESHAVJEE, S.; LIU, M. The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. **Crit Care**, v. 10(5), p. 130-143, 2006.

MUROHARA, T. J.; DELYANI, J. A.; ALBELDA, S. M.; LEFER, A. M. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. **J Immunol.**, v. 156, p. 3550-3557, 1996

NAGASE, T.; ISHII, S.; KUME, K.; UOZUMI, N.; IZUMI, T.; OUCHI, Y.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 8, p. 1071-1076, 1999.

NARITA, K.; KUWABARA, Y.; FUJII, Y. Lung injury after intestinal ischemia-reperfusion may be avoided by the reduced absorption of locally produced cytokines. **Surg. Today**, v. 34, n. 11, p. 937-942, 2004.

NERLICH, A. G.; NERLICH, M. L.; JOACHIM, H.; MULLER, P. K. Biochemical changes in parenchymal lung tissue associated with posttraumatic respiratory failure. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 14, n. 3, p. 190-198, 1984.

NICHOLS, T. C. NF-kappaB and reperfusion injury. **Drug News Perspect.**, v. 17, n. 2, p. 99-104, 2004.

OKAMOTO, T.; AKUTA, T.; TAMURA, F.; VAN DER VLIET, A.; AKAIKE, T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. **Biol. Chem.**, v. 385, p. 997-1006, 2004.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J. A.; IKEJIMA, T.; CONNOLLY, R. J.; DINARELLO, C. A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p. 1162-1172, 1988.

OSMAN, M.; RUSSELL, J.; GRANGER, D. N. Lymphocyte-derived interferon-gamma mediates ischemia-reperfusion-induced leukocyte and platelet adhesion in intestinal microcirculation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 296, n. 3, p. G659-663, 2009.

PARK, Y. W.; KANG, Y. M.; BUTTERFIELD, J.; DETMAR, M.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. **Am. J. Pathol.**, v. 165, v. 6, p. 2087-2098, 2004.

PARKS, W. C.; SHAPIRO, S. D. Matrix metalloproteinases in lung biology. **Respir. Res.**, v. 2, p. 10-19, 2001.

PASS, H. I.; MEW, D.; PASS, H. A.; TEMECK, B. K. The Macrophage, TNF, and Other Cytokines. **Chest Surg. Clin. N. Am.**, v. 5, p. 73-90, 1995.

PATAN, S. Vasculogenesis and angiogenesis. **Cancer Treat. Res.**, v. 117, p. 3-32, 2004.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 64, p. 403-434, 1995.

PUGIN, J.; RICO, B.; STEINBERG, K. P.; SUTER, P. M.; MARTIN, T. R. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.153, p. 1850–1856, 1996.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 288, n. 1, p. L3-L15, 2005.

RAINES, E. W. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. **Int. J. Exp. Pathol**, v. 81, p. 173–182, 2000.

REMICK, D. G.; GARG, S. J.; NEWCOMB, D. E.; WOLLENBERG, G.; HUIE, T. K.; BOLGOS, G. L. Exogenous Interleukin-10 Fails to Decrease the Mortality or Morbidity of Sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 26, p. 895-904, 1998.

REMICK, D. G.; BOLGOS, G. R.; SIDDIQUI, J. Six at six: interleukin- 6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. **Shock**, v. 17, p. 463–467, 2002.

RHEE, J. S.; SANTOSO, S.; HERRMANN, M.; BIERHAUS, A.; KANSE, S. M., MAY, A. E; NAWROTH, P. P.; COLMAN, R. W.; PREISSNER, K. T.; CHAVAKIS, T. New aspects of integrin-mediated leukocyte adhesion in inflammation: regulation by haemostatic factors and bacterial products. **Curr. Mol. Med.**, v. 3, n. 4, p. 387-392, 2003.

RIBES, J. A.; FRANCIS, C. W.; WAGNER, D. D. Fibrin induces release of von Willebrand factor from endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 117-123, 1987.

RICO, B.; NICOD, L.; LACRAZ, S. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 154, p. 346–352, 1996.

ROMAN, J. Extracellular matrices and lung inflammation. **Immunol. Res.**, v. 15, p. 163–178, 1996.

ROMANI DE WIT, T. R.; VAN MOURIK, J. A. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 14, p. 241–255, 2001.

ROSEN, S. D. Ligands for L-selectin: Homing, inflammation, and beyond. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p.129-156, 2004.

ROSSI, A.; PERGOLA, C.; CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L. The role of 5-lipoxygenase and leukotrienes in shock and ischemia-reperfusion injury. **Scientific. World Journal.**, v. 22, p. 56-74, 2007.

RUBIN, D. B.; WIENER-KRONISH, J. P.; MURRAY, J. F.; GREEN, D. R.; TURNER, J.; LUCE, J. M.; MONTGOMERY, A. B.; MARKS, J. D.; MATTHAY, M. A. Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. **J. Clin. Invest.**, v. 86, n. 2, p. 474-480, 1990.

SABHARWAL, A. K.; BAJAJ, S. P.; AMERI, A.; TRICOMI, S. M.; HYERS, T. M.; DAHMS, T. E.; TAYLOR, F. B. JR.; BAJAJ, M. Tissue factor pathway inhibitor and von Willebrand factor antigen levels in adult respiratory distress syndrome and in a primate model of sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, n. 3, p. 758-767. (Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 151(6), following 2118, 1995).

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 389-400, 1995.

SCARABELLI, T. M.; PASINI, E.; STEPHANOU, A.; COMINI, L.; CURELLO, S.; RADDINO, R.; FERRARI, R.; KNIGHT, R.; LATCHMAN, D. S. Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 40, n. 1, p. 155-161, 2002.

SCHNURR, M.; THEN, F.; GALAMBOS, P.; SCHOLZ, C.; SIEGMUND, B.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4704-9, 2000.

SEEKAMP, A.; WARD, P. A. Ischemia-reperfusion injury. **Agents Actions Suppl**, v. 41, p. 137-152, 1993.

SHASBY, D. M.; RIES, D. R.; SHASBY, S. S.; WINTE, M. C. R. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin, **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 282, p. L1330-L1338, 2002.

SHIGEMATSU, T.; WOLF, R. E.; GRANGER, D. N. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. **Microcirculation**, v. 9, p. 99-109, 2002.

SIEMIATKOWSKI, A.; KLOCZKO, J.; GALAR, M.; CZABAN, S. von Willebrand factor antigen as a prognostic marker in posttraumatic acute lung injury. **Haemostasis**, v. 30, n. 4, p. 189-195, 2000.

SIMMY, T.; ANUP, R.; PRABHU, R.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Effect of surgical manipulation of the rat intestine on enterocyte populations. **Surgery**, v. 130, n. 3, p. 479-488, 2001.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SIROIS, M. G.; JANCAR, S.; BRAQUET, P.; PLANTE, G. E.; SIROIS, P. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. **Prostaglandins**, v. 36, p. 631-644, 1988.

SKOLD, C. M.; LIU, X.; UMINO, T.; ZHU, Y.; OHKUNI, Y.; ROMBERGER, D. J.; SPURZEM, J. R.; HEIRES, A. J.; RENNARD, S. I. Human neutrophil elastase augments fibroblast-mediated contraction of released collagen gels. **American Journal of Respir. Crit. Care Med.**, v. 159, p. 1138-1146, 1999.

SLUPSKI, M.; SZADUJKIS-SZADURSKA, K.; SZADUJKIS-SZADURSKI, R.; SZADUJKIS-SZADURSKI, L.; WŁODARCZYK, Z.; ANDRUSZKIEWICZ, J.; SINJAB, A. T. Nitric oxide and thromboxane A₂ modulate pulmonary pressure after ischemia and intestinal reperfusion. **Transplant. Proc.**, v. 38, n. 1, p. 334-37, 2006.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1654, n.1, p. 13-22, 2004.

SOUZA, D. G.; CARA, D. C.; CASSALI, G. D.; COUTINHO, S. F.; SILVEIRA, M. R.; ANDRADE, S. P.; POOLE, S. P.; TEIXEIRA, M. M. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 8, p. 1800-1808, 2000.

SOUZA, D. G.; GUABIRABA, R.; PINHO, V.; BRISTOW, A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **J. Immunol.**, v. 170, n. 9, p. 4759-4766, 2003.

SOUZA, D. G.; VIEIRA, A. T.; PINHO, V.; SOUSA, L. P.; ANDRADE, A. A.; BONJARDIM, C. A.; MCMILLAN, M.; KAHN, M.; TEIXEIRA, M. M. NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, n. 2, p. 246-254, 2005.

STALLION, A.; KOU, T. D.; MILLER, K. A.; DAHMS, B. B.; DUDGEON, D. L.; LEVINE, A. D. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. **J. Surg. Res.**, v. 105, p. 145-152, 2002.

STARCKX, S.; VAN DEN STEEN, P. E.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization. **Leuk. Lymphoma**, v. 43, n. 2, p. 233-241, 2002.

STEEBER, D. A.; VENTURI, G. M.; TEDDER, T. F. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. **Trends Immunol.**, v. 26, n. 1, p. 9-12, 2005.

SUDO, L. S.; LEME, J. G. The inflammatory responses of rats depleted of lymphocytes or with an artificial obstruction of the thoracic duct. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 61, n. 2, p. 176-185, 1980.

SUN, Z.; WANG, X.; DENG, X.; LASSON, A.; WALLEN, R.; HALLBERG, E.; ANDERSON, R. The influence of intestinal ischemia and reperfusion on bidirectional intestinal barrier permeability, cellular membrane integrity, proteinase inhibitors, and cell death in rats. **Shock**, v. 10, n. 3, p. 203-212, 1998.

TAKAYAMA, M.; ISHIBASHI, M.; ISHII, H.; KURAKI, T.; NISHIDA, T.; YOSHIDA, M. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 4, p. 1800-1807, 2001.

TETLEY, T. D. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. **Thorax**, v. 48, n. 5, p. 560-565, 1993.

THICKETT, D. R.; ARMSTRONG, L.; MILLAR, A. B. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 166, p. 1332-1337, 2002.

THOMAS, S.; KARNIK, S.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Surgical manipulation of the small intestine and its effect on the lung. **J. Surg. Res.**, v. 106, n. 1, p. 145-156, 2002.

TINSLEY, J. H.; WU, M.H.; M. A. W.; TAULMAN, A. C.; YUAN, S. Y. Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells, **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 24930–24934, 1999.

TOEWS, G. B. Cellular alteration in fibroproliferative lung disease. **Chest**, v. 116, p. 1112S–1116S, 1999.

TORII, K.; IIDA, K.; MIYAZAKI, Y.; SAGA, S.; KONDOH, Y.; TANIGUCHI, H.; TAKI, F.; TAKAGI, K.; MATSUYAMA, M.; SUZUKI, R. Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 155, p. 43–46, 1997.

TORIKATA, C.; VILLIGER, B.; KUHN, C.; MCDONALD, J. A. Ultrastructural distribution of fibronectin in normal and fibrotic human lung. **Lab. Invest.**, v. 52, p. 399–408, 1985.

TURNAGE, R. H.; KADESKY, K. M.; BARTULA, L.; GUICE, K. S.; OLDHAM, K. T.; MYERS, S. I. Splanchnic PGI₂ release and "no reflow" following intestinal reperfusion. **J Surg. Res.**, v. 58, n. 6, p. 558–564, 1995.

TURNAGE, R. H.; LANOUE, J. L.; KADESKY, K. M.; MENG, Y.; MYERS, S. I. Thromboxane A₂ mediates increased pulmonary microvascular permeability after intestinal reperfusion. **J. Appl. Physiol.**, v. 82, n. 2, p. 592–598, 1997.

TUROWSKI, P.; MARTINELLI, R.; CRAWFORD, R.; WATERIDGE, D.; PAPAGEORGIOU, A. P.; LAMPUGNANI, M. G.; GAMP, A. C.; VESTWEBER, D.; ADAMSON, P.; DEJANA, E. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. **J. Cell Sci.**, v. 121, p. 29–37, 2008.

VAN DER POLL, T.; MARCHANT, A.; BUURMAN, W. A.; BERMAN, L.; KEOGH, C. V.; LAZARUS, D. D.; NGUYEN, L.; GOLDMAN, M.; MOLDAWER, L. L.; LOWRY, S. F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J. Immunol.**, v. 155, p. 5397–5401, 1995.

VAN DER POLL, T.; JANSEN, P. M.; MONTEGUT, W. J.; BRAXTON, C. C.; CALVANO, S. E.; STACKPOLE, S. A.; SMITH, S. R.; SWANSON, S. W.; HACK, C. E.; LOWRY, S. F.; MOLDAWER, L. L. Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. **J. Immunol.**, v. 158, p. 1971–1975, 1997.

VON DER WEID, P. Y.; MUTHUCHAMY, M. Regulatory mechanisms in lymphatic vessel contraction under normal and inflammatory conditions. **Pathophysiology**. Epub ahead of print, 2009.

VAN SOEREN, M. H.; DIEHL-JONES, W. L.; MAYKUT, R. J.; HADDARA, W. M. Pathophysiology and implications for treatment of acute respiratory distress syndrome. **AACN Clin. Issues.**, v. 11, n. 2, p. 179-197, 2000.

VAPORCIYAN, A. A.; DELISSER, H. M.; YAN, H. C.; MENDIGUREN, I. I.; THOM, S. R.; JONES, M. L.; WARD, P. A.; ALBELDA, S. M. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. **Science**, v. 262, p. 1580–1582, 1993.

WAGNER, D. D.; MAYADAS, T.; MARDER, J. Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. **J. Cell Biol.**, v. 102, p. 1320–1324, 1986.

WARD, N. S.; CASSERLY, B.; AYALA, A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med.*, v. 29, n.4, p. 617-625, 2008.

WARE, L. B.; EISNER, M. D.; THOMPSON, B. T.; PARSONS, P. E.; MATTHAY, M. A. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 170, n. 7, p. 766-772, 200.

WIEST, R.; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 397–425, 2003.

WILSON, M.S.; WYNN, T. A. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. **Mucosal Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 103-121, 2009.

WU, B.; IWAKIRI, R.; TSUNADA, S.; UTSUMI, H.; KOJIMA, M.; FUJISE, T.; OOTANII, A.; FUJIMOTO, K. Enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 649-658, 2002.

XIAO, F.; EPPIHIMER, M. J.; YOUNG, J. A.; NGUYEN, K.; CARDEN, D. L. Lung neutrophil retention and injury after intestinal ischemia/reperfusion. **Microcirculation**, v. 4, n. 3, p. 359-367, 1997.

YENDE, S.; D'ANGELO, G.; KELLUM, J. A.; WEISSFELD, L.; FINE, J.; WELCH, R. D.; KONG, L.; CARTER, M.; ANGUS, D. C. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 177, p. 1242-1247, 2008.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T. V.; STOKES, K. Y.; GRANGER, D. N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation**, v. 113, p. 2105-12, 2006.

ZINGARELLI, B.; YANG, Z.; HAKE, P. W.; DENENBERG, A.; WONG, H. R. Absence of endogenous interleukin 10 enhances early stress response during post-ischemic injury in mice intestine. **Gut**, v. 48, p. 610-622, 2001.

Anexo

Manuscrito publicado:

- *Nitric oxide mediates lung vascular permeability and lymph-borne IL-6 after an intestinal ischemic insult.* Breithaupt-faloppa, A. C.; **Vitoretti, L. B.**; Coelho, F. R.; dos Santos Franco, A. L.; Domingos, H. V.; Sudo-Hayashi, L. S.; Oliveira-Filho, R. M.; Tavares de Lima, W. **Shock**, v. 32, n. 1, p. 55-61, 2009.